

**Caracterización de Lignina en Material Lignocelulósico Utilizando Espectroscopia de
Resonancia Magnética Nuclear**

Edgar Eduardo Velasco Quintero

Trabajo de Grado para Optar el Título de Químico.

Director

Juan Carlos Poveda Jaramillo

PhD. en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2018

Tabla de Contenido

Introducción	11
1. Objetivos	14
1.1. Objetivo General	14
1.2. Objetivos Específicos	14
2. Química de la Lignina	14
2.1. Modificación Química	18
3. Resonancia Magnética Nuclear	20
3.1. Resonancia magnética nuclear en estado líquido	22
3.2. Resonancia magnética nuclear en estado sólido	24
4. Extracción de Lignina	26
5. Métodos Experimentales	28
5.1. Extracción y purificación de lignina	28
5.2. RMN Líquido 1D ^{13}C cuantitativo	30
5.3. Experimento ^{13}C DEPT 135° (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)	31
5.4. RMN Líquido 2D HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)	32
5.5. RMN Líquido 2D HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)	33

5.6. RMN de Sólidos 1D ^{13}C HPDEC (High Power Decoupling)	34
5.7. RMN de Sólidos 1D ^{13}C CP/TOSS (Cross Polarization/Total Sideband Supression)	35
5.8. RMN de Sólidos 2D HETCOR (Heteronuclear Correlation)	36
6. Resultados Y Discusión	37
6.1. Espectro 1D ^{13}C cuantitativo	37
6.2. Espectro 1D ^{13}C DEPT 135°	41
6.3. Espectro 2D HSQC	43
6.4. Espectro 2D HMBC	45
6.5. Espectro 1D ^{13}C HPDEC	48
6.6. Espectro 1D ^{13}C CP/TOSS	49
6.7. Espectro 2D ^{13}C - ^1H HETCOR	51
7. Conclusiones	53
Referencia bibliográfica	56

Lista de Tablas

Tabla 1. Potencial energético para biomasa residual vegetal en Colombia.	11
Tabla 2. Diferentes métodos para el aislamiento de lignina.	27
Tabla 3. Asignación a las señales obtenidas en el espectro ^{13}C .	39
Tabla 4. Asignación a las señales obtenidas en el espectro 2D HSQC.	45
Tabla 5. Asignación a las señales obtenidas en el espectro 2D HMBC.	46
Tabla 6. Asignación a las señales del residuo alifático del espectro ^{13}C HPDEC.	49
Tabla 7. Asignación a las señales obtenidas en el espectro ^{13}C CP/TOSS.	50
Tabla 8. Asignación a las señales de lignina obtenidas en el espectro 2D HETCOR.	51

Lista de Figuras

- Figura 1. Monolignoles precursores de la lignina: *p*-hidroxifenil (H), Siringil (S) y Guayacil (G). 15
- Figura 2. Algunos enlaces existentes dentro de la lignina: a. enlaces β -O-4', b. enlaces β - β' , c. enlaces β -5', d. enlaces β -1'. Nota: Adaptado de Yuan et al., 2011. 16
- Figura 3. Esquema respresentativa de la estructura de lignina en madera blanda. Nota: Adaptado de Zakzeski, Bruijninx, Jongerius y Weckhuysen, 2010. 16
- Figura 4. Esquema representativo de estructura de lignina en madera dura. Nota: Adaptado de Zakzeski et al., 2010. 17
- Figura 5. Posibles derivados quimicos de la lignina. Nota: Adaptado de Isikgor y Becer, 2015. 19
- Figura 6. Enlaces complejo lignina-carbohidrato: a. fenil glucósido, b. γ -ester, c. eter bencílico. Nota: Adaptado de Yuan et al., 2011. 23
- Figura 7. Secuencia básica de pulso RMN ^{13}C . 31
- Figura 8. Secuencia básica de pulsos DEPT. Nota: Adaptado de Balci, 2005, p.372. 31
- Figura 9. Secuencia de pulsos en un experimento típico 2D RMN. Nota: Adaptado de Field et al., 2015. 33
- Figura 10. Secuencia de pulso del experimento HMBC. Nota: Adaptado de Furrer, 2012. 34

Figura 11. Secuencia de pulsos experimento de polarización cruzada. Nota: Adaptado de Duer, 2002, p.81.	36
Figura 12. Secuencia de pulsos experimento HETCOR. Nota: Adaptado de Apperley, Harris y Hodgkinson, 2012, p.123).	37
Figura 13. Estructuras presentes en la muestra de lignina analizada: enlace β -O-4' (A), Guayacil (G), Siringil (S), ácido <i>p</i> -cumárico (PCA). Nota: Adaptado de Yuan et al., 2011.	38
Figura 14. Espectro ^{13}C cuantitativo de la muestra de lignina.	39
Figura 15. Espectro 1D ^{13}C RMN DEPT 135° de muestra de lignina.	42
Figura 16. Diastereoisómeros de la estructura de lignina tipo β -O-4'. Siringil (A), Guayacil (B). Nota: Adaptado de Bardet et al., 2009	43
Figura 17. Espectro HSQC obtenido de la muestra de lignina: (a). Región alifática, (b). Región aromática.	44
Figura 18. Espectro HMBC de la muestra de lignina.	46
Figura 19. Interacciones entre núcleos Carbono-Hidrógeno presentes en la estructura tipo β -O-4'.	47
Figura 20. Interacciones entre nucleos de Carbono-Protón en las estructuras Guayacil, Siringil y ácido <i>p</i> -cumárico.	47
Figura 21. Espectro ^{13}C HPDEC obtenido de la muestra de lignina	48
Figura 22. Espectro ^{13}C CP/TOSS de la muestra de lignina.	50
Figura 23. Espectro 2D HETCOR de la muestra de lignina.	52

Resumen

Título: Caracterización de Lignina en Material Lignocelulósico Utilizando Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear. *

Autor: Edgar Eduardo Velasco Quintero. **

Palabras clave: Lignina, lignocelulósico, guayacil, siringil, *p*-hidroxifenil, RMN.

Descripción:

Lignina es el segundo biopolímero más abundante presente en la vida vegetal, este biopolímero se encuentra en los subproductos industriales que actualmente se desechan en Colombia y que pueden ser aprovechados debido a su potencial energético, ofreciendo varias oportunidades para emplear su versatilidad en múltiples aplicaciones. Siendo el principal uso su modificación química para preparar una amplia gama de productos químicos, bloques de construcción y polímeros.

En el presente trabajo de investigación se propone caracterizar la lignina obtenida a partir del residuos industriales de palma africana, mediante el uso de la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de líquidos y sólidos con diferentes secuencias de pulsos de edición espectral, correlación heteronuclear, transferencia de polarización, entre otros. Los resultados obtenidos en estos experimentos, demostraron que la lignina extraída está compuesta principalmente por unidades Siringil y Guayacil, característico de una lignina proveniente de madera dura. La cuantificación de las señales, mostraron que la cantidad de unidades Siringil es mayor que las unidades Guayacil, demostrando que esta proporción promueve principalmente el enlace β -O-4' en la polimerización de la lignina. Se cuantificó el contenido de ácido *p*-cúmarico; compuesto que se encuentra presente en menor cantidad debido a la metodología utilizada en la extracción de lignina en la muestra, compuesta por raquis y fibra del mesocarpio del fruto de la palma.

* Trabajo de Grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Juan Carlos Poveda, PhD. Química.

Abstract

Title: Characterization of Lignin in Lignocellulosic Material Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.*

Author: Edgar Eduardo Velasco Quintero.**

Keywords: Lignin, lignocellulosic, guaiacyl, syringyl, *p*-hydroxyphenyl, NMR.

Description:

Lignin is the second most abundant biopolymer present in plant life, this biopolymer is found in the industrial by-products that are currently discarded in Colombia and that can be exploited due to their energy potential, offering several opportunities to use their versatility in multiple applications. The main use being its chemical modification to prepare a wide range of chemical products, building blocks and polymers.

In the present research, it is proposed to characterize the lignin obtained from the industrial waste of African palm, by using Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy of liquids and solids with different pulse sequences of spectral editing, heteronuclear correlation, polarization transfer and others. The results obtained in these experiments showed that the extracted lignin is composed mostly of Syringyl and Guaiacyl units, characteristic of a lignin from hardwood. The quantification of the signals showed that the amount of Syringyl units is greater than the Guaiacyl units, demonstrating that this ratio mostly promotes β -O-4' bonds in the polymerization of lignin. The content of *p*-cumaric acid was quantified; that compound is present in smaller quantity due to the methodology used in the extraction of lignin, composed of rachis and mesocarp fiber of the palm fruit.

* Bachelor Thesis

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Juan Carlos Poveda, PhD. Química.

Introducción

La lignina se encuentra entre los biopolímeros más abundantes de la tierra, ocupando el segundo lugar después de la celulosa. La lignificación está asociada con el desarrollo de sistemas vasculares en las plantas, proporcionando resistencia a la biodegradación y tensiones ambientales tales como cambios en el equilibrio del agua y la humedad. La presencia de lignina dentro de la pared de fibra celulósica, mezclada con hemicelulosa, crea un material compuesto natural que imparte fuerza y rigidez a árboles y plantas. Se estima que actualmente el planeta contiene 3×10^{11} toneladas métricas de lignina, con una tasa biosintética anual de aproximadamente 2×10^{10} toneladas y a su vez constituye aproximadamente el 30% del peso seco de las maderas blandas y el 20% del peso de las maderas duras (Argyropoulos y Menachem, 1997). Las principales propiedades que se evalúan en un subproducto industrial de origen vegetal con potencial como fuente lignocelulósico cuyo porcentaje de agua es superior al 30%, son variables como la humedad y la relación celulosa/lignina. Colombia posee un gran potencial energético en la biomasa obtenida de residuos vegetales (Patiño, 2014). Esta biomasa actualmente no se aprovecha debido al uso inadecuado de estos subproductos.

Tabla 1.

Potencial energético para biomasa residual vegetal en Colombia.

Potencial energético de biomasa residual en Colombia		
Tipo de residuo	Cant. Residuo [Ton/año]	Potencial energético [TJ/año]
Bagazo de caña	15.534.600	118.578
Palma de aceite	1.660.000	16.073
Plátano	11.500.000	6.600
Maíz	1.940.000	20.800
Banano	11.551.000	6.600

La lignina no es aprovechada como productos de alto valor a gran escala, actualmente se utiliza principalmente para la recuperación de energía en las plantas de celulosa. Sin embargo, a medida

que aumenta la contaminación ambiental debido al uso de combustibles fósiles, aumenta la demanda de recursos sostenibles y renovables (Norgren y Edlund, 2014). La sustitución de productos petroquímicos con alternativas sostenibles es cada vez más importante debido al crecimiento de la contaminación por el uso de combustibles fósiles. La lignina procedente de biomasa lignocelulósica es una alternativa renovable altamente prometedora debido a su potencial para obtener compuestos aromáticos y polímeros que se pueden utilizar como componentes para plásticos y resinas (Van de Pas *et al.*, 2011). Es importante una caracterización de la lignina a nivel molecular para conocer su estructura y características principales, que permita analizar su potencial en aplicaciones posteriores. Esta macromolécula es un constituyente de la pared celular integral en todas las plantas vasculares, incluyendo las variedades herbáceas, y en la utilización de la madera, la lignina se elimina durante la mayoría de procesos de fabricación de papel. La lignina es único entre los biopolímeros en que no existe un control limitado sobre su biosíntesis, y los factores que guían este proceso aún no se entienden completamente.

Los polímeros de lignina se forman en la pared celular principalmente de la reacción de oxidación de tres monolignoles (*p*-cumarílico, coniferílico, sinapílico) catalizados por peroxidasas. El contenido relativo de los principales monolignoles dependen del tipo de planta. El monolignol más abundante en las maderas blandas es el alcohol coniferílico, que puede llegar a superar el 95% del total de monolignoles presentes; mientras que en las maderas duras coexisten fundamentalmente los alcoholes coniferílico y sinapílico. En el caso de las plantas de tipo herbáceas, puede haber proporciones similares de los tres monolignoles principales. Estos compuestos del tipo monolignoles son interesantes reactivos de partida para la producción de compuestos aromáticos de alto valor añadido en la industria petroquímica, la cual utiliza

comúnmente recursos fósiles como materias primas (Chávez y Domine, 2013). Como materia prima natural y renovable, que se puede obtener a un costo asequible y con excelentes propiedades químicas y físicas, el potencial de sustitución de la lignina se extiende a cualquier producto que se obtenga actualmente de sustancias petroquímicas. Las áreas en las que la lignina es aplicable incluyen: emulsionantes, tintes, pisos sintéticos, secuestrantes, aglutinantes, materiales termoestables, agentes de dispersión, pinturas y combustibles para tratamientos para carreteras (Watkins, Nuruddin, Hosur, Tcherbi y Jeelani, (2015).

Se ha comprobado que la lignina tiene la capacidad de ser precursora de varios compuestos químicos útiles en la industria debido a su gran tamaño y alto porcentaje de anillos aromáticos en su estructura. Actualmente en Colombia la mayoría de esta lignina se encuentra en los subproductos industriales que se generan y terminan siendo desechados o en procesos de combustión. Sin embargo, la lignina tiene un potencial redox importante y contiene grupos químicos reactivos más diversos (restos hidroxilo, carboxilo y carbonilo aromáticos y alifáticos). Por tal motivo se estudia este biopolímero presente en las plantas, para que en un futuro se convierta en una gran fuente de energía renovable.

1. Objetivos

1.1. Objetivo General

Extraer y caracterizar a nivel molecular mediante el uso de técnicas de resonancia magnética nuclear, la lignina de biomasa residual lignocelulósica proveniente de subproductos industriales de la palma.

1.2. Objetivos Específicos

- Aislar la lignina en muestras de subproductos industriales de palma utilizando el método de extracción correspondiente a una lignina de tipo soda.
- Identificar la conformación y distribución de los monolignoles presentes en la molécula de lignina.
- Cuantificar y determinar la proporción de los monolignoles que conforman la molécula de lignina extraída de la biomasa residual de palma.
- Asignar el tipo de enlace que presentan los monolignoles en la polimerización de la lignina.

2. Química de la Lignina

La lignina es un polímero constituido a base de unidades fenilpropanoides que se encuentra en tipos celulares específicos de plantas vasculares, particularmente aquellos con paredes celulares engrosadas secundariamente involucradas en el transporte de agua o en la provisión de resistencia mecánica. Las tres subunidades básicas son: alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico. Estos monómeros se conocen como monolignoles: *p*-hidroxifenil (H), guayacil (G) y

siringil (S), cuando se incorporan al polímero de lignina (Figura 1). Los monolignoles se sintetizan a través de la ruta fenilpropanoide, que comparten otros metabolitos secundarios importantes, como los flavonoides y las cumarinas (Zhao y Dixon, 2011).

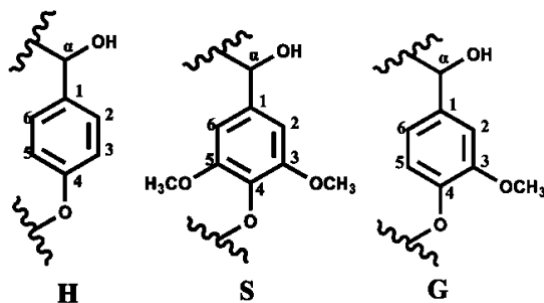


Figura 1. Monolignoles precursores de la lignina: *p*-hidroxifenil (H), siringil (S) y Guayacil (G).

Aunque la estructura compleja e irregular de la lignina ha sido ampliamente investigada, aún no se ha elucidado completamente. El problema principal es que no se puede aislar en una forma químicamente inalterada debido a la estrecha unión física y los enlaces químicos entre la lignina y los polisacáridos de la pared celular. Los principales enlaces que se presentan dentro de las macromoléculas de lignina son β -O-4', β - β ', β -5', β -1', etc. (Figura 2). Aunque las proporciones relativas de estos enlaces varían con las especies de biomasa, el β -éter (β -O-4) es el vínculo más abundante entre todos ellos, mientras que los principales tipos de enlaces de complejo lignina carbohidrato vinculados en la madera se cree que son los enlaces fenil glucósido, ésteres y éteres de bencilo (Yuan, Sun, Xu y Sun, 2011; Balakshin, Capanema, Gracz, Chang y Jameel, 2011). Además del problema del método de extracción, la estructura de la lignina varía dependiendo del tipo de material vegetal que se esté analizando, los factores ambientales en la que este expuesta, edad y el tipo del tejido vegetal que presente.

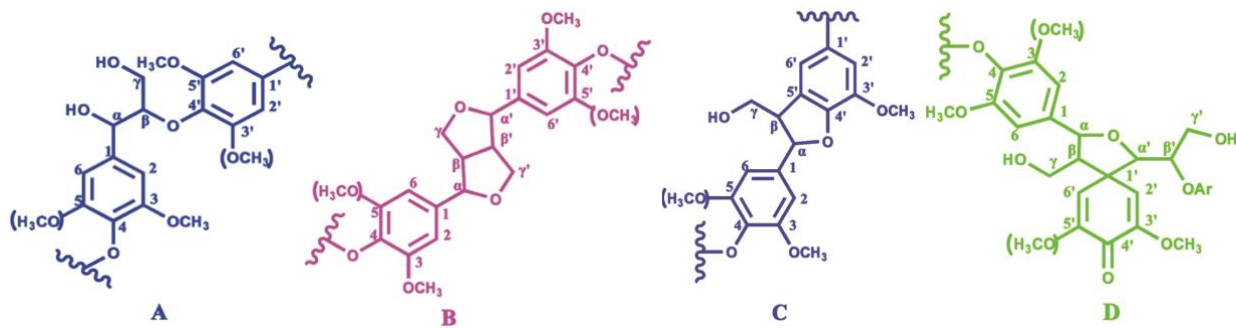


Figura 2. Algunos enlaces existentes dentro de la lignina: **a.** enlaces β -O-4', **b.** enlaces β - β' , **c.** enlaces β -5', **d.** enlaces β -1'. *Nota:* Adaptado de Yuan *et al.*, 2011.

En maderas blandas, el contenido promedio de lignina varía entre 25 y 30% (p/p). La lignina de madera blanda está compuesta predominantemente por una gran proporción de *guayacil* (G) y algunas subunidades *p*-hidroxifenil (H) no metoxiladas (Figura 3.). El contenido de lignina de madera dura oscila entre el 22 y el 27% (p/p) y se forma a partir de la polimerización de las subunidades *guayacil* (G) y *siringil* (S) (Figura 4). En pasto, la lignina puede ser compuesta de todas las subunidades H, G y S y su contenido puede variar de 1 a 19% (p/p) de la materia seca total dependiendo de las especies de plantas o etapas de crecimiento (Mann *et al.*, 2009).

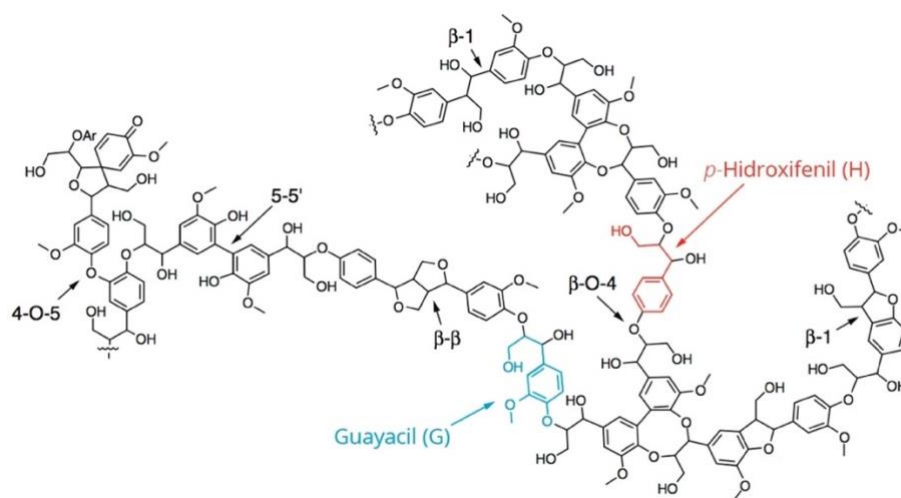


Figura 3. Esquema representativa de la estructura de lignina en madera blanda. *Nota:* Adaptado de Zakzeski, Bruijninx, Jongerius y Weckhuysen, 2010.

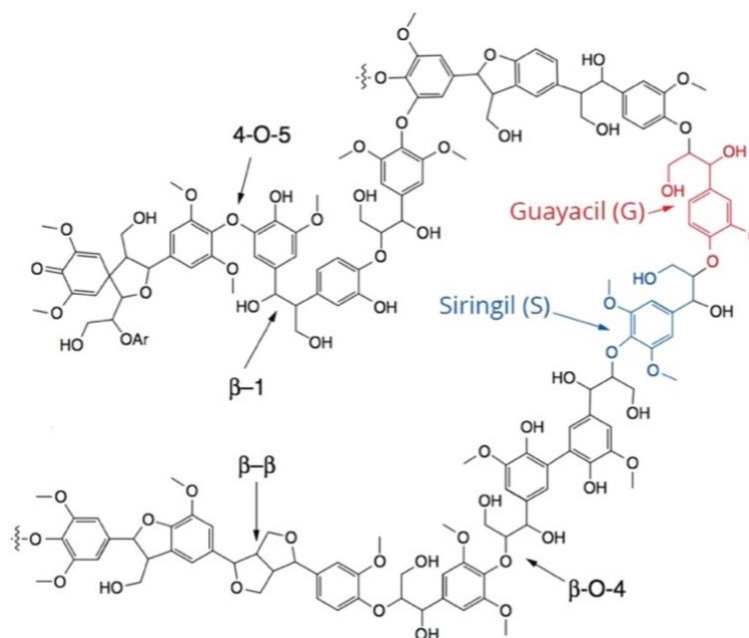


Figura 4. Esquema representativo de estructura de lignina en madera dura. *Nota:* Adaptado de Zakzeski *et al.*, 2010.

La estructura química de la lignina de madera blanda no varía mucho entre las especies de plantas, mientras que las estructuras de lignina de madera dura varían mucho de una especie de planta a otra. La principal diferencia entre especies en las ligninas de madera dura es la relación S/G, que influye en las características estructurales, como la cantidad de enlaces β -O-4, el grado de condensación o el contenido de metoxilo (Akiyama, Sugimoto, Matsumoto y Meshitsuka, 2002). Las diferencias entre la madera blanda y la lignina de madera dura también afectan la aplicación de lignina y sus derivados. Por ejemplo, las ligninas de madera dura contienen más grupos metoxilo que las ligninas de madera blanda. La presencia de grupos metoxi ayuda a liberar más compuestos fenólicos, metanol y CH_4 de la lignina de madera dura que las ligninas de madera blanda en procesos termoquímicos (Wikberg y Maunu, 2004). Además, el alto contenido de grupos metoxilo de las ligninas de madera dura tiende a dar estructuras menos condensadas después de la pirólisis que las ligninas de madera blanda (Zhao *et al.*, 2014).

2.1. Modificación química

Los principales usos de la lignina se han clasificado en dos grupos diferentes: (I) sin modificación química, la lignina se incorpora directamente en la matriz para proporcionar propiedades nuevas o mejoradas, y (II) con modificación química para preparar una amplia gama de productos químicos, bloques de construcción y polímeros.

La modificación química de la lignina se puede clasificar en tres categorías principales:

1. Fragmentación o despolimerización de lignina para usar lignina como fuente de carbono o para dividir la estructura de lignina en macrómeros aromáticos.
2. Modificación mediante la creación de nuevos sitios activos químicos.
3. Modificación química de grupos hidroxilo (Laurichesse y Aérous, 2014).

Debido a su estructura de fenol impedida, la lignina se puede usar directamente con elastómeros o poliolefinas como antioxidante (Pouteau, Dole, Cathala, Averous y Boquillon, 2003), estabilizador de luz ultravioleta y posiblemente también como retardante de llama (De Chirico *et al.*, 2003). Varios estudios han investigado la incorporación de la lignina en una matriz polimérica como los termoplásticos industriales (poliésteres, poliamidas, policaprolactona y polihidroxibutirato) para reducir los costos de producción de polímeros (Pouteau, Baumberger, Cathala y Dole, 2004). La lignina también se puede utilizar para fines para los que se requieren polielectrolitos o propiedades de superficie activa o se desea la tendencia a la reacción de autocondensación. Por ejemplo, los lignosulfonatos proporcionan plasticidad y una mejor fluidez a algunos polímeros, y promueven una mayor resistencia a la compresión, durabilidad y una mejor uniformidad del material final (Myrvol, 2008). Aunque la lignina presenta posibles aplicaciones

directas en la industria de polímeros, solo puede incorporarse en pequeñas cantidades, teniendo en cuenta su degradación térmica y sus propiedades mecánicas. La modificación de la lignina parece ser la mejor manera de utilizar este producto renovable como material de partida para la síntesis de polímeros y productos químicos. La figura 5, muestra un resumen de todos los posibles productos químicos en los que la lignina puede ser transformada mediante reacciones específicas.

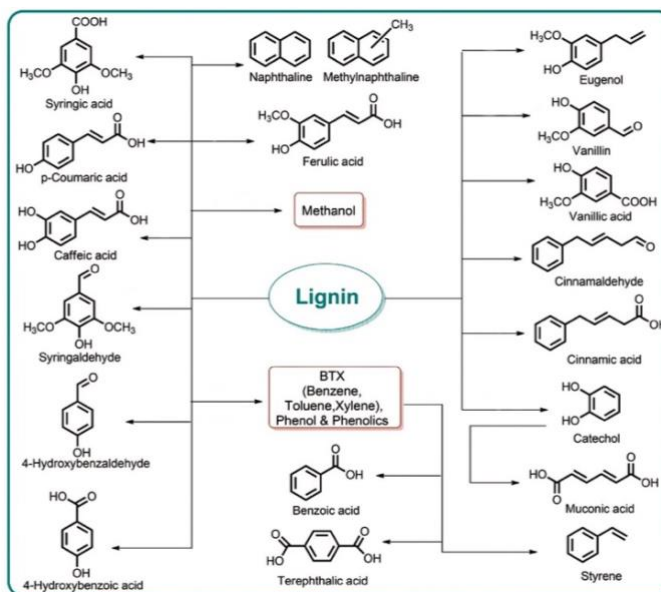


Figura 5. Posibles derivados químicos de la lignina. *Nota:* Adaptado de Isikgor y Becer, 2015.

Una vez que la lignina se aísla y se descomponen en sus subunidades aromáticas, los procesos posteriores no requieren demasiada mejora. Ya existe una tecnología madura para la conversión de estos compuestos en monómeros y polímeros básicos. La combinación de las tecnologías nuevas y actuales proporcionaría nuevas oportunidades para la conversión de lignina en polímeros básicos como tereftalato de polietileno (PET), poliestireno, poliésteres insaturados, polianilina y muchos más polímeros aromáticos. No obstante, debe tenerse en cuenta que las alternativas a los polímeros aromáticos a base de petróleo podrían realizarse completamente mediante la valorización de la lignina (Isikgor y Becer, 2015).

3. Resonancia Magnética Nuclear

La resonancia magnética nuclear (RMN) ha sido ampliamente usada con fines cualitativos de identificación de núcleos dentro de un ambiente químico determinado, empleando el área integrada de cada señal para establecer el número de núcleos de un tipo determinado que existen en la molécula a estudiar. No obstante, también es posible usar la resonancia magnética nuclear como un arma analítica cuantitativa, siempre que en el espectro sea posible identificar el grupo o grupos de núcleos asignables. Métodos de química húmeda, como el análisis de grupos funcionales y técnicas de degradación pueden ser muy precisos para grupos funcionales específicos y restos estructurales. Sin embargo, cada técnica proporciona información limitada y no es capaz de proporcionar una visión general de toda la estructura de la lignina.

La ventaja de los métodos espectroscópicos sobre las técnicas de degradación es el análisis de toda la estructura de la lignina y la detección directa de restos de ella. La utilidad de la resonancia magnética nuclear (RMN) en estado sólido y líquido sobre otras técnicas espectroscópicas, como infrarrojo (IR), ultravioleta-visible (UV), y la espectroscopia Raman, es que posee una resolución mucho mayor, lo que permite obtener una mayor cantidad de información (Capanema, Balakshin y Kadla, 2004) y probablemente la principal ventaja de la RMN como método analítico cuantitativo frente a las otras técnicas espectroscópicas, es la ausencia de valores análogos a coeficientes de absorción o coeficientes de extinción encontrados en otros tipos de espectros. La intensidad de una señal de resonancia, para un núcleo dado, es proporcional al número de núcleos que intervienen en ella, y es independiente de la naturaleza química del núcleo.

En los primeros años desde su descubrimiento en 1946, la RMN es utilizada por los físicos para medir momentos magnéticos, hasta que el hallazgo de los desplazamientos químicos en los años cincuenta la convirtió en una herramienta muy poderosa para el estudio de la estructura molecular. Durante los años sesenta, coincidiendo con la comercialización de equipos con imanes superconductores y de transformada de Fourier al final de la década, la RMN se convirtió en una técnica fundamental para el estudio de muestras líquidas y disoluciones en los laboratorios de química orgánica. Sin embargo, su éxito no fue completo, ya que las sustancias sólidas tenían que disolverse o fundirse previamente para poder acceder a la información química. Un espectro de RMN convencional de un líquido o una disolución está formado por señales muy estrechas y bien resueltas que contienen información molecular. Sin embargo, un experimento similar con un sólido produce señales muy anchas, que pueden llegar a ser de varios kHz o incluso MHz, lo que impide la obtención de información de manera fácil. La idea de Andrew (1958) y Lowe (1959) para suplir la insuficiencia de movimiento molecular en sólidos fue la rotación macroscópica de la muestra. Estos autores mostraron que si una muestra sólida se gira suficientemente rápido alrededor de un eje que forma un ángulo de 54.7° con la dirección principal del campo magnético externo, denominado ángulo mágico, el ensanchamiento dipolar se promedia y se pueden obtener espectros de alta resolución (Landucci, 1985; Belton y Tanner, 1989).

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear ha facilitado enormemente la investigación de la estructura molecular de sistemas de pocos átomos hasta moléculas tan complejas como polímeros, p.e. la lignina, hasta proteínas de alto peso molecular. Esto se debe principalmente a la gran cantidad de información sobre conectividad entre átomos que se puede obtener en equipos de alta resolución. La RMN- ^{13}C ha sido la técnica más utilizada en el estudio cuantitativo y cualitativo

de la estructura de la lignina, como también el uso de técnicas de pulsos de dos y tres dimensiones que se han implementado para identificar las estructuras unitarias (Guerra, Filpponen, Lucia y Argyropoulos, 2006).

3.1. Resonancia magnética nuclear en estado líquido

A pesar de que la estructura molecular de la lignina no ha sido completamente determinada, se han realizado algunos trabajos cuantitativos y cualitativos que han aproximado mucho más a los científicos a entender esta estructura tan compleja. Unos de los métodos más utilizados en esta investigación es el uso de espectros cuantitativos de RMN ^{13}C y 2D HSQC (Heteronuclear single quantum coherence). Sin embargo, cuando la preparación de lignina es rica en carbohidratos asociados, la cuantificación de la estructura de la lignina y el complejo lignina-carbohidrato con RMN ^{13}C cuantitativa no es tan eficiente. Como consecuencia de la superposición de señales de carbohidratos en la región de la cadena lateral del espectro de RMN ^{13}C se puede comprometer la integración y la posterior cuantificación de las estructuras de lignina, el método de RMN 2D se ha utilizado para hacer frente al problema de solapamiento y se han hecho intentos para cuantificar la información de los espectros HSQC. Sin embargo, el método basado en RMN 2D podría suministrar cantidades relativas de las estructuras detectadas en lugar de los valores absolutos (Yuan *et al.*, 2011; Capanema *et al.*, 2004; Heikkinen, Toikka, Karhunen y Kilpelainen, 2003; Ralph *et al.*, 2006).

Un estudio realizado por M. Balakshin, E. Capanema, H. Gracz; mostró que la combinación de estas dos técnicas proporciona datos confiables para la cuantificación de los enlaces del complejo lignina-carbohidrato de éter bencílico, fenil glucósido y tipos de γ -ester en preparaciones de

madera dura y blanda (Figura 6). Demostraron además que la preparación de la madera con una enzima celulolítica es el mejor método para evaluar los enlaces tipo éter bencílico del complejo lignina-carbohidrato. Sin embargo, la extracción de la lignina en madera cruda molida con ácido acético es preferible para la cuantificación de enlaces fenil glucósido y γ -éster (Balakshin, 2011).

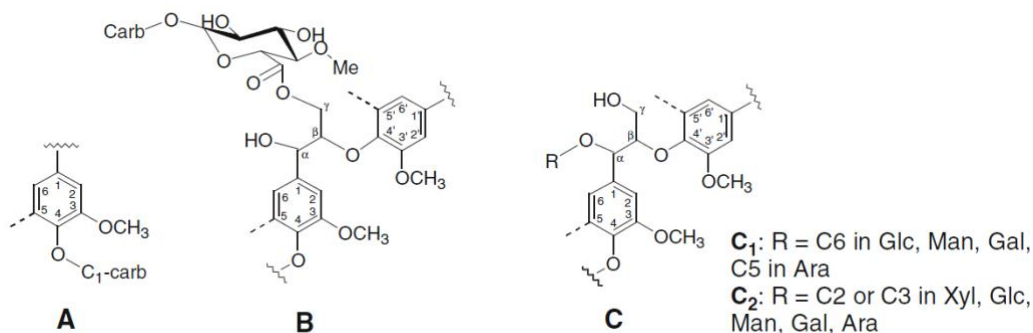


Figura 6. Enlaces complejo lignina-carbohidrato: **a.** fenil glucósido, **b.** γ -éster, **c.** éter bencílico. *Nota:* Adaptado de Yuan *et al.*, 2011.

T.-Q. Yuan, S.-N. Sun, utilizando experimentos RMN-¹³C y HSQC, mostraron resultados parecidos a los descritos anteriormente. El primer método propuesto por Björkman, que extrae la lignina de la madera finamente molida con dioxano acuoso (MWL) y que permite obtener lignina nativa tiene un rendimiento limitado y depende en gran medida del tiempo de molienda (Yuan *et al.*, 2011; Balakshin *et al.*, 2011; Capanema *et al.*, 2004). Debido a esto, los autores utilizaron otro procedimiento que combina acción enzimática y acidólisis leve (EMAL) en busca de incrementar los rendimientos de la extracción (Wu y Argyropoulos, 2003). Se ha reportado que este método principalmente rompe enlaces lignina-carbohidratos en lugar de otros enlaces asociados exclusivamente a la lignina, permitiendo obtener además altos rendimientos y elevada pureza (Guerra *et al.*, 2006).

En los resultados reportados se puede observar que ambos métodos exhibían estructuras similares y las principales subestructuras eran β -O-4' aril éter (A), resinol (B), phenylcoumaran (C) (Figura 2), con abundancias semejantes. Sin embargo también se cuantificaron algunas características estructurales diferentes. Utilizando el método de extracción MWL se observa una cantidad baja de spirodienone (D) (Figura 2), mientras que esta subestructura no se pudo detectar en la preparación de EMAL. Finalmente llegaron a la conclusión de que ambos métodos podrían ser combinados para comprender la estructura de lignina en la pared celular. Cuando la preparación contiene altas cantidades de carbohidratos asociados, es necesario el uso de RMN-¹³C cuantitativo y 2D HSQC para cuantificar la lignina y enlaces complejo lignina-carbohidrato presentes en la muestra (Yuan *et al.*, 2011).

3.2. Resonancia magentica nuclear en estado sólido

La lignina, cuando esta presente en la pared celular es llamada protolignina para distinguirla de la lignina que se ha aislado mediante algún método de extracción, ya que se consideran en gran medida diferentes en varios aspectos. La protolignina se forma en geles de polisacáridos por polimerización de monolignoles de manera irreversible; y estos monolignoles así como los polisacáridos varían con la edad y el tipo de célula. Como consecuencia, la protolignina se encuentra enlazada de manera física y química con los polisacáridos, haciendo que la estructura y distribución de la macromolécula en la pared celular sea heterogénea (Terashima, Atalla y Vanderhart, 1997). Como resultado, es imposible el aislamiento cuantitativo de la lignina de la pared celular manteniendo su naturaleza heterogénea y su estructura tridimensional intacta.

Por tal motivo se han buscado otros métodos espectroscópicos que permitan analizar la protolignina y su macro-estructura nativa. La RMN en estado sólido y el uso de técnicas de polarización cruzadas y ángulo mágico de giro (MAS) es una técnica alternativa muy valiosa que puede ayudar a obtener información valiosa en ese estudio. La característica más importante es que, si las condiciones experimentales son las adecuadas es posible distinguir átomos químicamente equivalentes pero que magnéticamente no lo sean.

L. Yann, R. Jesus, D. Luc, B. Nicolas, G. Roger y D. Anthony; estudiaron la lignina extraída de la biomasa lignocelulósica utilizando el método Klason y emplearon el análisis ^{13}C NMR en estado sólido para investigar la estructura aromática de la lignina, aprovechando que es un método no destructivo y no está limitado por la insolubilidad de la muestra (como en el caso de la RMN en estado líquido) debido al método utilizado en la extracción. Los experimentos de polarización cruzada CP/MAS proporcionan información química en un corto tiempo de análisis y una buena relación señal/ruido. Sin embargo, no permite un análisis cuantitativo confiable. Por lo tanto, emplearon la técnica de polarización cruzada con transferencia de tipo Hartmann-Hahn (CP/MAS APHH), para aumentar la relación señal a ruido y acortar el tiempo de análisis. La principal preocupación sobre el análisis de la estructura de la biomasa es la confiabilidad cuantitativa de este experimento. Por esta razón, demostraron que la técnica CP/MAS APHH utilizada en este estudio conduce a espectros casi similares a las señales de polarización directa DP/MAS. Finalmente, obtuvieron resultados de una lignina compuesta por unidades Siringil y Guayacil (Brech *et al.*, 2016).

Otro estudio realizado por L. Yann, R. Jesus, D. Luc, B. Nicolas, G. Roger y D. Anthony; utilizando un experimento de correlación heteronuclear HETCOR con irradiación del tipo Lee-Goldburg (FSLG), analizaron los cambios estructurales de la biomasa en función de su tratamiento químico para biocombustibles. Este análisis se debe realizar en estado sólido, ya que la red de polímeros nativos en biomasa lignocelulósica y otros materiales sólidos, tales como carbón, coque o biochar, difícilmente pueden analizarse mediante RMN en estado líquido. En este espectro se puede evidenciar señales de una lignina compuesta por estructuras Siringil y Guayacil, así como también restos de carbohidratos. En conclusión, los resultados finales obtienen un aumento dramático de la resolución en la dimensión del protón obtenido por el desacoplamiento homonuclear FSLG junto con un campo alto, esto hace que esta técnica sea una opción única para el análisis de protones y carbonos de muestras en estado sólido (Brech *et al.*, 2014).

4. Extracción De Lignina

La lignina puede ser aislada del material lignocelulósico mediante una variedad de métodos que implican diferentes procesos mecánicos y/o químicos. Estos métodos se pueden agrupar en dos vías principales. El primer grupo incluye métodos en los que se libera la celulosa y hemicelulosa mediante solubilización, dejando la lignina como residuo insoluble; mientras que el segundo grupo incluye métodos que implican la disolución de la lignina, dejando como residuos insolubles la celulosa y la hemicelulosa, seguido de la recuperación de lignina a partir de la fase líquida.

Debido a la naturaleza heterogénea de las materias primas (madera y pulpa), no hay ningún método disponible actualmente para el aislamiento cuantitativo de lignina natural o residual, sin el riesgo de modificarla estructuralmente durante el proceso. Sin embargo, la información obtenida

sobre la reactividad química y la estructura de la lignina aislada es valiosa. En la Tabla 2 se presentan algunos de los principales métodos comúnmente empleados para aislar lignina residual.

Tabla 2.

Diferentes métodos para el aislamiento de lignina. Nota: Adaptado de Chávez y Domine, 2013.

Preparación	Metodología	Observaciones
Lignina de madera molida (MWL).	Extracción acuosa con dioxano de la madera finamente molida.	Se obtiene alrededor del 20% de rendimiento a partir de la lignina original.
Lignina enzimática de madera molida (MWEL).	Residuo que queda después de la hidrólisis de los carbohidratos de la madera finamente molida.	Rendimiento del 95%, pero contiene 10-12% de carbohidratos, no es completamente soluble en los solventes comunes.
Lignina tipo Kraft y tipo sulfito.	Disolución química de lignina a elevadas temperaturas y presiones.	No es representativo de la lignina original, importante subproducto en la producción de papel.
Lignina tipo soda.	Disolución en medio alcalino de fibras no madereras tales como, paja, bagazo de caña, etc.	Ligninas de bajo peso molecular, insolubles en agua y con bajos niveles de contaminantes.
Lignina Klason	Insoluble, residuos condensados después de la hidrólisis de polisacáridos con ácido sulfúrico.	No es representativo de la lignina original.

Existen numerosos métodos para aislar la lignina de la biomasa. En procesos industriales a gran escala en los que la lignina se separa de los materiales vegetales para obtener el componente polisacárido, están optimizados para producir fibra de planta con características uniformes, mientras que la lignina generalmente se considera como un desecho. En consecuencia, estos procedimientos de aislamiento industrial a menudo alteran significativamente la estructura química de la lignina; pero existen procedimientos a escala de laboratorio que producen menos cambios en la estructura de lignina nativa (Guerra *et al.*, 2006; Mao, Holtman, Scott, Kadla y Schmidt, 2006).

Las ligninas varían en la estructura de acuerdo con su método de aislamiento y la fuente. Las maderas duras desarrollan una lignina diferente a la de las maderas blandas. Sin embargo, las diferencias son menores en lo que respecta a la mayoría de las aplicaciones (Lora y Glasser, 2002). Los procesos de sulfato y sulfito son el aislamiento dominante, produciendo más del 90% de la lignina industrial. En estos procesos, la lignina kraft y los lignosulfonatos se obtienen como un subproducto del procesamiento de la madera. Pero debido a las condiciones fuertemente alcalinas, rompen la lignina en cadenas más pequeñas, haciéndola soluble en agua y en soluciones alcalinas. Existen otros procesos para aislar la lignina producida en plantas piloto y a escalas de laboratorio. Estas ligninas se obtienen usando soluciones ácidas o alcoholes (lignina Organosolv), condiciones alcalinas fuertes (lignina sódica) y sales en estado líquido (líquidos iónicos). Las ligninas extraídas con alcoholes y soda, se consideran las ligninas más puras porque son libres de azufre y contienen una cantidad baja de impurezas, por lo tanto, estas estructuras de lignina se consideran las más cercanas a la estructura en la forma natural (Acosta *et al.*, 2018). Por estos motivos, la extracción en medio sódico es la mejor opción para la caracterización de lignina en la biomasa residual.

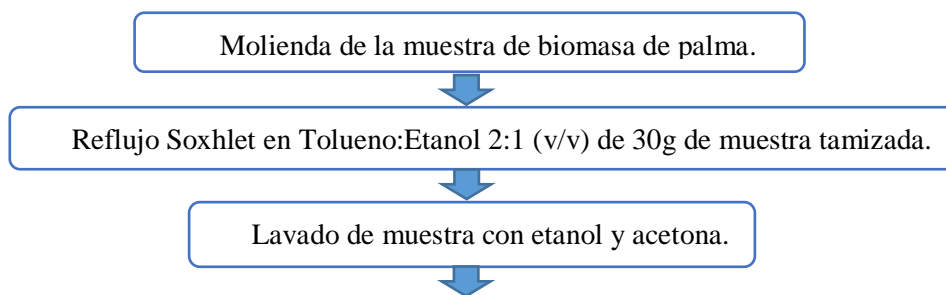
5. Metodos Experimentales

5.1. Extracción y purificación de lignina.

Una muestra de lignina se obtuvo de la biomasa residual de palma africana, compuesta por raquis y fibra del mesocarpio del fruto. Esta biomasa proviene de los cultivos de palma de Sabana de Torres, Santander, suministrada por Industrias Acuña Ltda. El raquis es un subproducto que resulta de un proceso de extracción de aceite con tratamiento de explosión con vapor de agua durante 5

minutos y posterior a esto, tratamiento mecánico con cuchillas para disminución de tamaño de partícula a 1-5 cm.

El proceso de molienda se realizó en un molino de cuchillas Thomas-Wiley Laboratory Mill Model 4 con un rejilla de 0,5 cm ubicado en el edificio Planta de Aceros de la Universidad Industrial de Santander. Se tomaron 30g de muestra y durante 6 horas se sometieron a reflujo en un sistema de extracción Soxhlet con una mezcla de Tolueno:Etanol relación 2:1 (v/v). Terminado el reflujo, la muestra se lava con abundante etanol y acetona, se seca a temperatura ambiente y se deja en un horno a 60°C durante 16 horas, obteniéndose 23,2g de muestra seca. A continuación, la muestra se trata con una solución del 5% de NaOH durante 12 horas en una relación 1g muestra/22 mL de soda. El sobrenadante se neutraliza con una solución 6M de HCl hasta alcanzar un pH de 5.5 y se rotaevapora hasta obtener 130 mL de solución concentrada. La hemicelulosa se precipita en etanol con un relación Solución:Etanol 1:3 (v/v). Se filtra el sólido (hemicelulosa) y el sobrenadante se rotaevapora hasta alcanzar un volumen de 100mL. Finalmente se precipita la lignina llevando la solución a pH 1.5. Esta lignina se filtra, se lava con agua acidificada (pH 1.5-2) y se deja secar a temperatura ambiente. El peso de la lignina extraída fue del 0,412g, representando el 1,37% de la muestra inicial de raquis de palma (Yuan *et al.*, 2011; Holtman, Chang y Jameel, 2006; Sun, Tomkinson, Sun y Wang, 2000). (Diagrama 1).



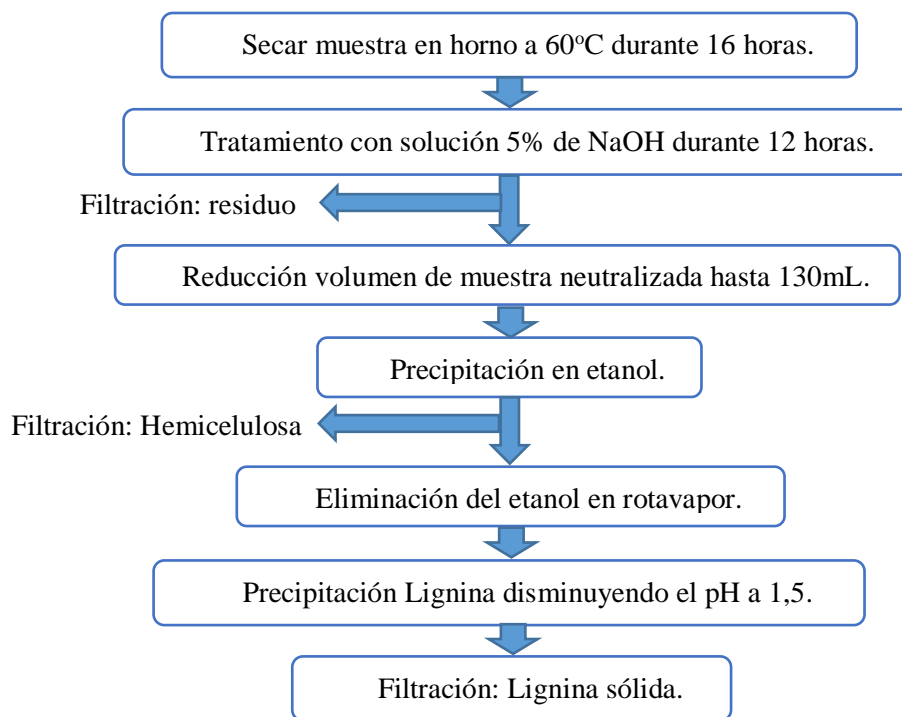


Diagrama 1. Diagrama de procedimiento de extracción y purificación de la lignina

5.2. RMN Líquido 1D ^{13}C cuantitativo.

Los espectros de RMN ^{13}C acoplados a ^1H afectan la multiplicidad de las señales debido al acoplamiento escalar ^1H - ^{13}C , las señales de los carbonos CH_3 se desdoblan en cuatro líneas, las señales de los carbonos CH_2 en tres líneas, las señales de los carbonos CH en dos líneas y carbonos cuaternarios aparecen como singuletes. En la práctica, la mayoría de los espectros de ^{13}C se registran generalmente con desacoplamiento de banda ancha de ^1H (Figura 7), lo que significa que cualquier acoplamiento entre núcleos de ^1H y ^{13}C se elimina irradiando fuertemente todos los protones mientras se observa el espectro de ^{13}C . Esta técnica proporciona singuletes (sin multiplicidad) para cada átomo de carbono único en la molécula. Tales espectros a menudo se describen como espectros $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN, donde la notación de ^1H entre corchetes indica que se aplica desacoplamiento de banda ancha en el canal de protones durante la adquisición del espectro de ^{13}C para eliminar el acoplamiento escalar C-H (Field *et al.*, 2015, p.17).

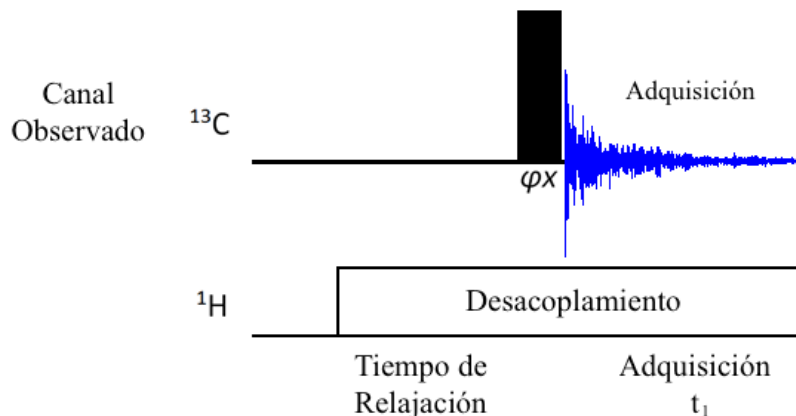


Figura 7. Secuencia básica de pulso RMN ^{13}C .

5.3. Experimento ^{13}C DEPT 135° (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)

DEPT es una mejora sin distorsión por transferencia de polarización y es un método útil para determinar la multiplicidad de los átomos de carbono. Las mediciones DEPT permiten la generación de subespectros para los grupos CH, CH₂ y CH₃.

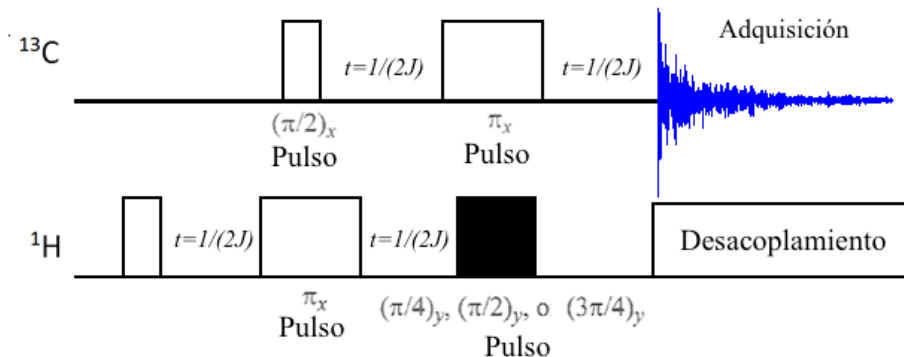


Figura 8. Secuencia básica de pulsos DEPT. Nota: Adaptado de Balci, 2005, p.372.

EL punto de partida de la secuencia de pulsos DEPT, como podemos ver en la Figura 8, es un pulso de 90° en el protón. Este pulso rota la magnetización desde el eje z hacia el eje y. Las líneas dobles del grupo CH comienzan a moverse en el plano xy en direcciones opuestas. Al final del tiempo de evolución $t = 1/(2J)$, los vectores se alinean a lo largo del eje +x y el eje -x con una diferencia de fase de 180°. Un pulso de 180° en los protones reenfoca los efectos de falta de

homogeneidad. Simultáneamente, un pulso de 90° en los átomos de carbono gira los vectores de magnetización ^{13}C desde el eje z hacia el eje y . Después del tiempo de evolución posterior $t = 1/(2J)$, un pulso de 90° en los protones desde la dirección y gira ambos componentes del doblete de magnetización de protones a los ejes $+x$ y $-x$, respectivamente. Esta secuencia de pulsos causa la transferencia de polarización de protones a átomos de carbono. Un pulso de 180° en los carbonos cancela el efecto de inhomogeneidad en la magnetización de carbono. Al final del segundo tiempo de evolución $t = 1/(2J)$, se aplica un pulso de protón. El experimento DEPT con un pulso de 135° en los protones permite distinguir entre los átomos de carbono CH_2 y átomos de carbono CH/CH_3 . La diferenciación entre los átomos de carbono CH y CH_3 es directa, ya que los átomos de carbono CH pueden reconocerse fácilmente desde el primer espectro resgistrado con un pulso de 90° (Balci, 2005, p.372).

5.4. RMN Líquido 2D HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence).

En el experimento de RMN bidimensional más simple, la adquisición implica el uso de dos pulsos de radiofrecuencia (rf), separados por un período de tiempo, t_1 (Figura 9). El primer pulso rf excita los núcleos de la muestra que pueden, durante t_1 , interactuar entre sí a través del acoplamiento spin-spin, interacciones dipolares o por diferentes mecanismos. Después de aplicar el segundo pulso, la señal de decaimiento inducido libre (FID) es adquirida. El valor de t_1 se incrementa progresivamente y el proceso se repite para adquirir una nueva FID (Field, Li y Magill, 2015, p.25).

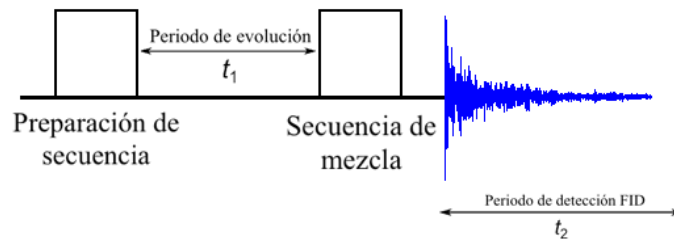


Figura 9. Secuencia de pulsos en un experimento típico 2D RMN. *Nota:* Adaptado de Field *et al.*, 2015.

Los espectros HSQC correlacionan los protones en una molécula con los átomos de carbono a los que están unidos directamente. Si bien existen diferencias técnicas en las secuencias de pulsos que utiliza el espectrómetro para adquirir los espectros, en la práctica, los experimentos HSQC y HMQC proporcionan esencialmente la misma información. El HSQC editado por multiplicidad proporciona información adicional acerca de si las señales surgen de grupos CH, CH₂ o CH₃, de forma muy similar a un experimento DEPT.

Las señales cruzadas en los experimentos HSQC se observan cuando hay una correlación escalar de una resonancia a la frecuencia de protones en el eje F_2 y otra a la frecuencia del carbono al que está directamente unido en el eje F_1 . Los espectros HSQC están calibrados para separar únicamente las correlaciones que se producen a través de un enlace, es decir, para detectar solo las correlaciones que surgen de los protones unidos directamente a un carbono; por lo tanto, los carbonos no protonados no dan lugar a señales cruzadas en el espectro (Field *et al.*, 2015, p.37).

5.5. RMN Líquido 2D HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

HMBC (correlación heteronuclear a múltiples enlaces) es un experimento en 2D utilizado para correlacionar, o conectar, ¹H y ¹³C para átomos separados por enlaces múltiples. El experimento está diseñado para suprimir acoplamientos de un enlace, pero unos pocos se observan en la mayoría de los espectros. No hay forma de saber cuántos enlaces separan un protón y un átomo de carbono

cuando se observa una señal transversal. Estos espectros de correlación de múltiples enlaces nos proporcionan información muy útil sobre la estructura. Obtenemos de forma indirecta información sobre conectividades de carbonos. Además, podemos observar correlaciones entre los carbonos cuaternarios con protones cercanos, de modo que podamos ubicar las posiciones de los átomos de carbono cuaternarios (Lamber y Mazzola, 2004, p.193). La secuencia de pulso HMBC se muestra en la Figura 10.

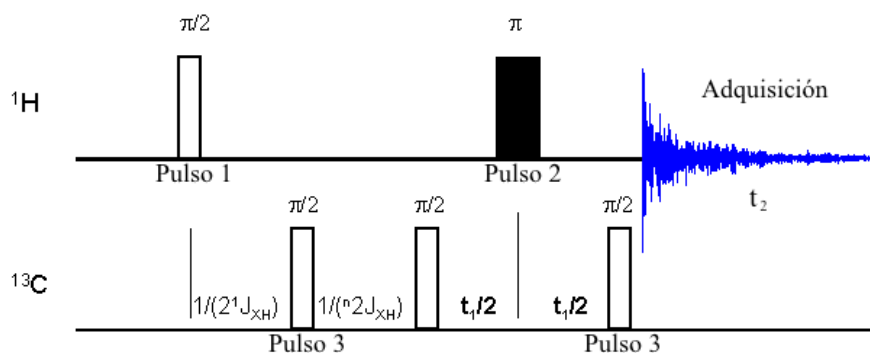


Figura 10. Secuencia de pulso del experimento HMBC. *Nota:* Adaptado de Furrer, 2012.

El primer pulso de 90° aplicado en ^{13}C , sirve para suprimir las correlaciones de un enlace de distancia. El segundo pulso de 90° , crea el acoplamiento de largo alcance deseado entre los núcleos ^1H - ^{13}C . El último pulso de 90° en ^{13}C después del período de evolución t_1 , es seguido inmediatamente por el período de detección t_2 . La señal detectada durante t_2 está modulada en fase por los acoplamientos homonucleares ^1H . Finalmente, el espectro 2D es generado por una transformada de Fourier con respecto a t_1 y t_2 .

5.6. RMN de Sólidos 1D ^{13}C HPDEC (High Power Decoupling).

El desacoplamiento de alta potencia (HPDEC) se aplica para eliminar los efectos complicados del acoplamiento heteronuclear. La fuente más común de acoplamiento dipolar es a partir de espirales ^1H a los espines de los núcleos que se observan. La aplicación de irradiación de alta potencia a la

frecuencia de la resonancia ^1H hace que esos giros sufran transiciones repetidas a una velocidad determinada por la amplitud de la irradiación. Si la velocidad es lo suficientemente rápida, se pueden observar los núcleos deseados sin los efectos de ensanchamiento del acoplamiento dipolar (Tang y Wang, 2008) .

5.7. RMN de Sólidos 1D ^{13}C CP/TOSS (Cross Polarization/Total Sideband Supression).

La técnica CP se basa en la tendencia de la magnetización para fluir de poblaciones de espín muy polarizados a poblaciones menos polarizados cuando los dos se ponen en contacto. En el caso de núcleos diferentes se requiere la aplicación de dos campos de radiofrecuencia (RF), uno sintonizado para los spines I, y el otro para los spines S. El experimento de polarización cruzada se describe en la Figura 11. Primero, la magnetización del protón se sitúa en el eje -y mediante la aplicación de un pulso de 90° . A continuación se aplica un pulso en el eje -y, que se denomina de “spín lock” $B_1(I)$, para mantener la magnetización del protón en este eje durante lo que se denomina el tiempo de contacto. Simultáneamente se aplica otro campo de radiofrecuencia a los spines S durante ese mismo tiempo de contacto. Las amplitudes de los dos pulsos se tienen que ajustar cuidadosamente para que se cumpla la condición de Hartmann-Hahn.

$$\gamma_I \beta_1^I = \gamma_S \beta_1^S$$

Siendo γ_I y γ_S las constantes giromagnéticas, y B_1^I y B_1^S los campos de radiofrecuencia. En estas condiciones, cuando las frecuencias de nutación de los dos núcleos en sus respectivos sistemas de ejes rotatorios se igualan, se produce el contacto dipolar y el intercambio de magnetización con conservación de la energía entre los dos sistemas de spines. Finalmente, se detectan los spines S, mientras se desacoplan los I.

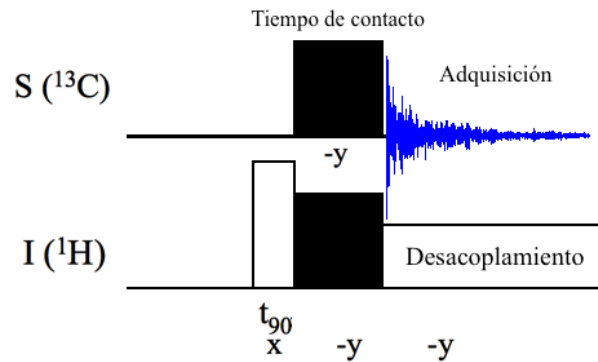


Figura 11. Secuencia de pulsos experimento de polarización cruzada. *Nota:* Adaptado de Duer, 2002, p.81.

En la mayoría de los experimentos de RMN los tiempos de adquisición o los tiempos de medida están determinados por el tiempo de relajación T_1 del núcleo que se detecta. En las condiciones de polarización cruzada, el tiempo entre dos adquisiciones consecutivas depende del tiempo de relajación del núcleo que transfiere la magnetización. Como los protones en estado sólido relajan más rápidamente que la mayoría de otros núcleos con espín $1/2$, en un período de tiempo dado se pueden adquirir muchos más barridos, que en un experimento de un pulso que detecta el núcleo S. Como contrapartida, en este experimento ya no existe una relación directa entre la intensidad de la señal y la abundancia de las correspondientes en la muestra debido a los diferentes parámetros involucrados en el experimento. Para la eliminación de bandas laterales giratorias, se utiliza la técnica TOSS (total suppression sidebands). Este método aplica una serie de pulsos de 180° en puntos colocados con precisión en un período anterior a la adquisición. Usualmente se usan cuatro impulsos de 180° con ciclos de fase para compensar las imperfecciones del pulso (Duer, 2002, p.81).

5.8. RMN de Sólidos 2D HETCOR (Heteronuclear Correlation).

Un espectro HETCOR muestra correlaciones espaciales entre dos espines heteronucleares. En la versión más simple de este tipo de experimento (Figura 12), la magnetización transversal se genera

para una especie nuclear, I (^1H) y se permite que evolucione a su frecuencia característica en t_1 . La magnetización restante se transfiere luego a otra especie nuclear, S (^{13}C) en un paso de polarización cruzada y un FID recogido en t_2 . La transformada de Fourier en t_1 y t_2 resulta en un espectro de frecuencias bidimensional con picos cruzados entre las señales de espín I y S , indicando que la polarización cruzada tuvo lugar entre los giros correspondientes, y por lo tanto, estos giros están cerca en el espacio.

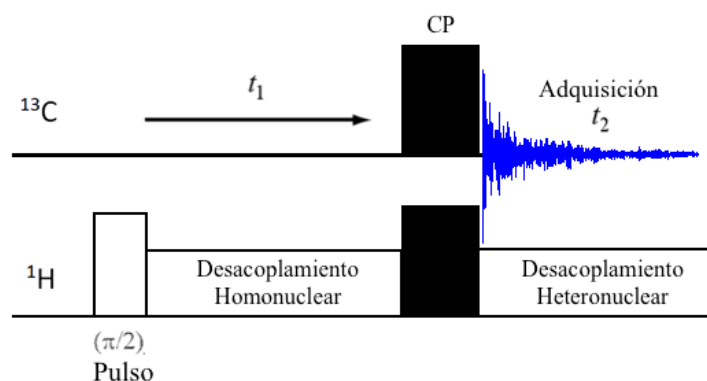


Figura 12. Secuencia de pulsos experimento HETCOR. Nota: Adaptado de Apperley, Harris y Hodgkinson, 2012, p.123).

Una aplicación importante de los espectros de correlación es ayudar a la asignación de espectros de RMN unidimensionales, conectando picos conocidos en un espectro con picos desconocidos en el otro. Sin embargo, para sistemas orgánicos complejos, las ambigüedades introducidas por la difusión del spin ^1H a menudo limitan la utilidad del experimento HETCOR simple. Los experimentos basados en acoplamiento indirecto pueden proporcionar respuestas más claras en estos casos (Apperley *et al.*, 2012, p.123-124).

6. Resultados Y Discusión

6.1. Espectro 1D ^{13}C cuantitativo.

El espectro RMN ^{13}C (Figura 14), permite observar señales de carbonos cuantificables ayudando a elucidar mayormente la estructura de la lignina. Estas señales se listan en la Tabla 3 y se definieron de acuerdo con publicaciones anteriores (Holtman *et al.*, 2006; Hage *et al.*, 2009; Meng, Kang, Zhang, Wu y Sun, 2012; Shi, Xiao, Deng y Sun, 2013; Sun, Wen, Xu y Sun, 2010; Yuan, Sun, Xu y Sun, 2011; Bolaños, Felizón, Heredia y Jiménez, 1999). La ausencia de señales entre δ_c 90-102 en el espectro de RMN indica la ausencia de contenidos de carbohidratos. Las señales que se encuentran en la región aromática comprendida entre δ_c 154-103 ppm, nos confirman que la estructura de lignina esta compuesta principalmente por unidades Guayacil (C_5 , C_6 , respectivamente δ_c 115.22, 121.40 ppm) y Siringil ($\text{C}_{2/6}$, $\text{C}_{3/5}$, respectivamente δ_c 104.22, 152.20 ppm), verificando que la estructura de la lignina en la muestra es de tipo S/G. Además, presenta señales provenientes de los carbonos $\text{C}_{3/5}$, $\text{C}_{2/6}$, C_4 y C_γ de la estructura del ácido *p*-cumárico. Estructuras representadas en la Figura 13.

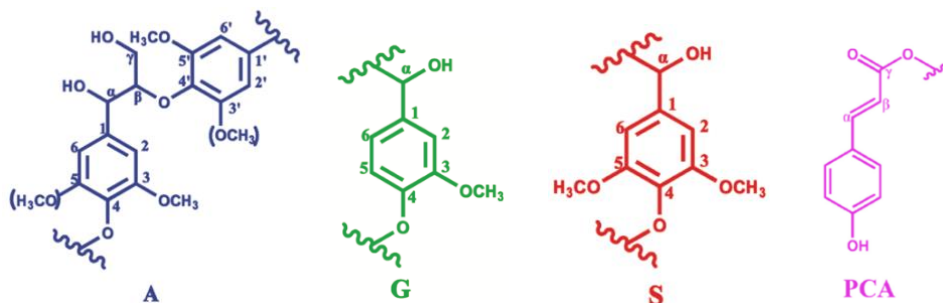


Figura 13. Estructuras presentes en la muestra de lignina analizada: enlace β -O-4' (A), Guayacil (G), Siringil (S), ácido *p*-cumárico (PCA). Nota: Adaptado de Yuan *et al.*, 2011.

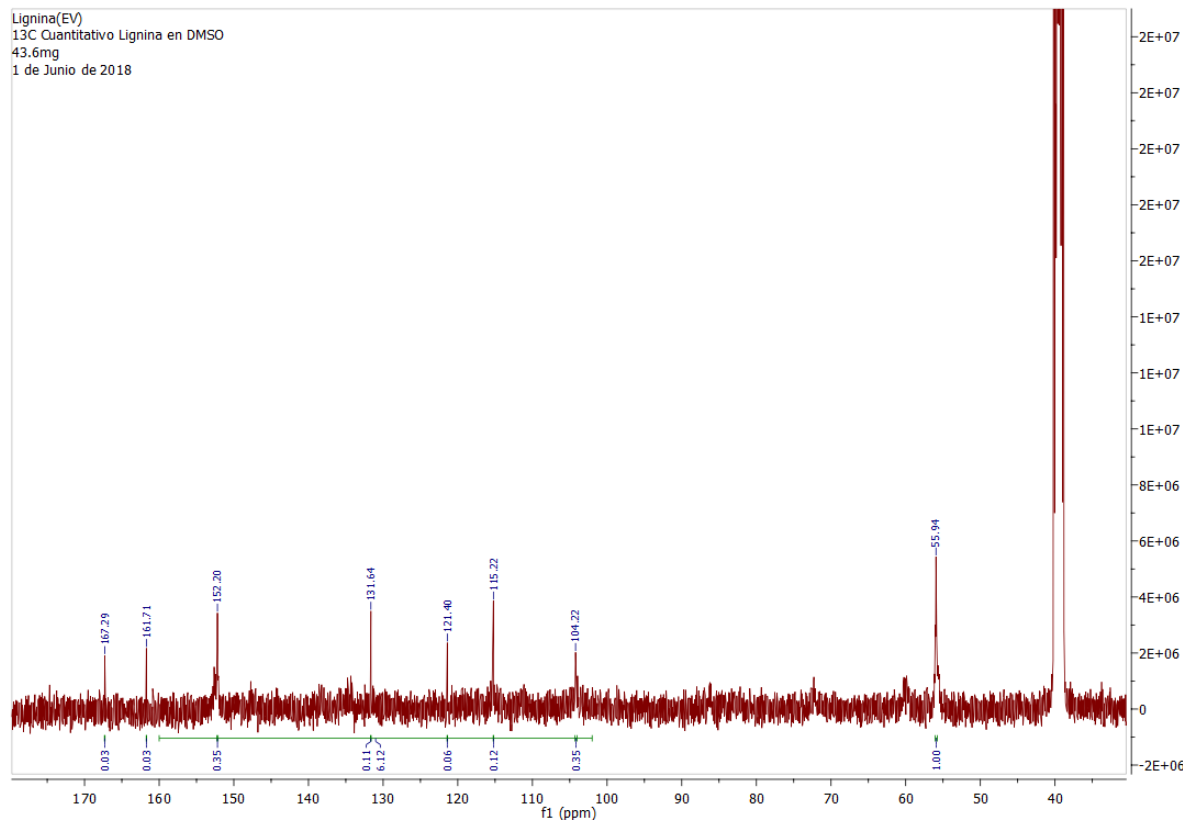


Figura 14. Espectro ^{13}C cuantitativo de la muestra de lignina.

Para cuantificar las sub-estructuras de lignina correspondientes a cada señal del espectro ^{13}C RMN, se tomó como referencia la parte aromática del espectro correspondiente al desplazamiento entre δ 160-102 ppm (Figura 14), suponiendo que incluye 6.12 carbonos aromáticos (que representan todos los carbonos aromáticos más una contribución de 0.12 de la cadena lateral insaturada de restos coníferos y cumáricos). Los valores integrales para las referencias estándar internas seleccionadas y otras fracciones estructurales se expresaron en equivalencia por unidad anillo aromático (Ar). Los valores de las integrales de cada señal se listan en la Tabla 3.

Tabla 3.

Asignación a las señales obtenidas en el espectro ^{13}C .

Descripción	δ_{C}	$\sim\text{Ar}$	Asignación
-OCH ₃	55.94	1.00	C en metoxilos.
S _{2,6}	104.22	0.35	C _{2,6} en unidades de Siringil eterificado (S).
G ₅	115.22	0.12	C ₅ en unidades de Guayacil (G).
ρ -CA _{3,5}	115.22	0.12	C _{3,5} en ácido <i>p</i> -cumárico esterificado. (<i>p</i> CA)
G ₆	121.40	0.06	C ₆ en unidades de Guayacil (G).

ρ -CA _{2,6}	131.64	0.11	C _{2,6} en unidades de ácido <i>p</i> -cúmarico. (<i>p</i> CA)
S _{3,5}	152.20	0.35	C _{3,5} en unidades de Siringil eterificado enlace β -O-4'.
ρ -CA ₄	161.71	0.03	C ₄ en unidades de ácido <i>p</i> -cúmarico. (<i>p</i> CA)
ρ -CA ₇	167.29	0.03	C ₇ en unidades de ácido <i>p</i> -cumárico. (<i>p</i> CA)

La señal correspondiente al carbono 5 de la estructura Guayacil (δ_c 115.22 ppm) se encuentra solapada por una señal correspondiente a los carbonos 3 y 5 del ácido *p*-cumárico. Por lo tanto, para cuantificar los rastros de la estructura Guayacil se tomó en cuenta la integral de la señal δ_c 121.40 ppm, obteniendo un valor de 0.06 por anillo aromático (Ar). El valor de las integrales de las señales encontradas en δ_c 152.20 y 104.22 ppm, representa la cantidad de carbonos (C_{3,5} y C_{2,6} respectivamente) por anillo aromático existentes en la estructura Siringil. Como cada integral corresponde al valor de dos carbonos, se puede afirmar que la cantidad de Siringil presente en la muestra de lignina es de aproximadamente 0.175/Ar.

En la producción de pasta de papel existe una correlación directa entre la biodegradabilidad y la relación de unidades S y G presente en la lignina (S/G). Relaciones de S/G mayores resulta en rendimientos mayores y menos gastos de reactivo (González *et al.*, 1999). Las unidades S tienen 2 sustituciones aromáticas con un grupo metoxilo. Las unidades G tienen un grupo metoxilo en posición C-3 mientras la posición C-5 no está sustituida y queda disponible para la formación de enlaces carbono-carbono. Lignina con mayor cantidad de unidades G suelen tener una estructura más condensada y es más recalcitrante. La relación S/G (siringil a guayacil) en la macromolécula de lignina también se considera un parámetro importante en el proceso de biorrefinería. En el presente estudio, la relación S/G se estimó en aproximadamente 2.92. Generalmente, los fragmentos de lignina ricos en Siringil tienden a liberarse en primer lugar de la pared de la célula vegetal durante el proceso de deslignificación, y la alta relación S/G siempre conduce a un alto

contenido de enlaces β -O-4' en la macromolécula de la lignina. Por lo tanto, podemos seguir afirmando que la estructura de lignina estudiada se presenta mayormente con enlaces β -O-4'.

Las señales observadas en los desplazamientos δ 167.29, 161.71 y 131.64 ppm, comprueba que existe una pequeña concentración de ácido *p*-cumárico en la muestra final de lignina. La cantidad de ácido presente en la muestra, se esmitió mediante la integración de la señal δ 161.71 con un valor del 0.03/Ar, siendo mucho menor que las reportadas de las estructuras principales (G, S) de la lignina, indicando que el proceso de extracción y purificación utilizado en la parte experimental es favorable para el análisis.

6.2. Espectro 1D ^{13}C DEPT 135°.

La técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), ha demostrado ser superior a otras al proporcionar información sobre protones adheridos de manera confiable, eficiente y con alta selectividad. Es un método de transferencia de polarización de protón y carbono, por lo que los espectros DEPT son en realidad más sensibles que las adquisiciones normales. Se toma un conjunto de espectros con retardos de pulso ajustados para $\pi/2$ (DEPT-90°) y $3\pi/4$ (DEPT-135°). El espectro DEPT-135 muestra señales CH_3 , CH positivas, y señales negativas de CH_2 . Es importante entender que la aparición de señales positivas y negativas se puede revertir por fases, por lo que es necesario tener alguna forma de determinar si el espectro se ha configurado en fases para CH_2 positivo o negativo. Los carbonos cuaternarios son invisibles.

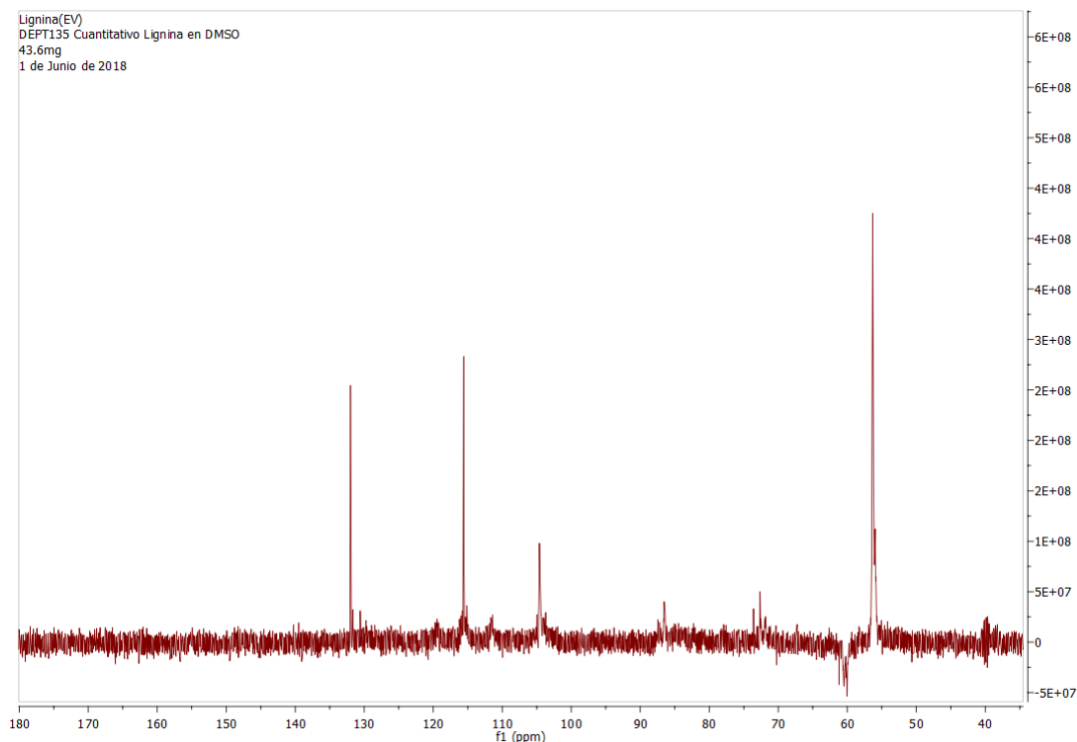


Figura 15. Espectro 1D ^{13}C RMN DEPT 135° de muestra de lignina.

El espectro DEPT 135° obtenido de la muestra de lignina (Figura 15), permite confirmar los resultados adquiridos en el espectro Carbono 13 cuantitativo. Las señales en 131.64 y 115.22 ppm representan los carbonos CH del anillo aromático de la estructura del ácido *p*-cúmarico en posiciones $\text{C}_{2/6}$ y $\text{C}_{3/5}$, respectivamente. La señal en 115.22 ppm pertenece también al carbono CH en posición C_5 del anillo aromático de la estructura Guayacil. La señal en 104.22 ppm comprende los carbonos CH en las posiciones $\text{C}_{2/6}$ del anillo aromático de la estructura Siringil. En la región de carbonos alifáticos, las señales en 86.1 ppm (C_β en S $\beta\text{-O-4}'$ erythro), 73.2 ppm (C_α en $\beta\text{-O-4}'$ G y S erythro), 72.3 ppm (C_α en $\beta\text{-O-4}'$ G y S threo), y 59.6 ppm (C_γ en $\beta\text{-O-4}'$ G y S, threo y erythro) pertenecen a la resonancia de los carbonos C_β , C_α y C_γ en enlaces $\beta\text{-O-4}'$, respectivamente (Figura 16). Como se observa en el espectro, la única señal negativa en 59,6 ppm corresponde al carbono C_γ en enlaces $\beta\text{-O-4}'$, siendo este el único CH_2 presente en la estructura de lignina. Estas señales junto con los resultados del espectro HSQC, ratifican que la estructura de lignina analizada

se encuentra mayoritariamente formada por enlaces β -O-4'. La señal en δ 55.94 ppm representa el CH₃ en el grupo metoxilo.

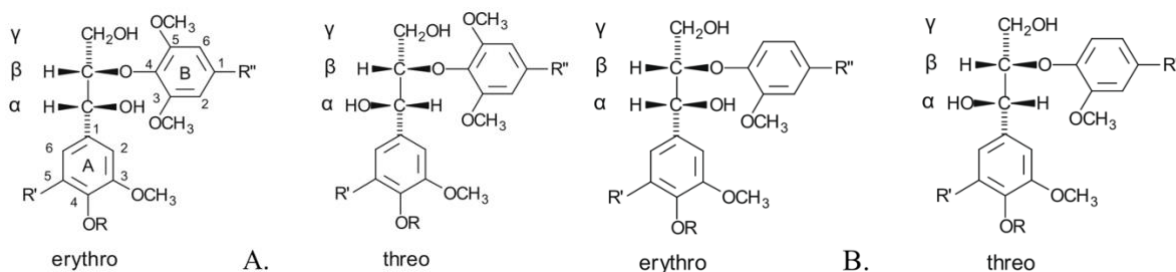


Figura 16. Diastereoisómeros de la estructura de lignina tipo β -O-4'. Siringil (A), Guayacil (B). *Nota:* Adaptado de Bardet *et al.*, 2009.

6.3. Espectro 2D HSQC.

2D ¹H-¹³C HSQC es una herramienta importante para el análisis cualitativo y cuantitativo de las estructuras de lignina. Esta provee resolución de señales superpuestas entre los espectros ¹H-¹³C RMN y revela tanto las unidades aromáticas y los diferentes enlaces entre unidades presentes en la lignina. Los resultados se muestran en la Figura 17. La muestra de lignina estudiada fue disuelta fácilmente en DMSO-*d*₆ debido al bajo contenido de carbohidratos asociados. Los espectros HSQC, proporcionan información sobre los enlaces interunitarios de cadena lateral (región δ_H/δ_C 2.8-6.0/50-110 ppm) y unidades aromáticas de lignina (región δ_H/δ_C 6.0-8.0/100-150 ppm). Las señales obtenidas en este análisis se listan en la Tabla 4 y se definieron de acuerdo con publicaciones anteriores (You, Zhang, Zhou y Xu, 2015; Zhang, Liu, Sun y Xie, 2013; Yang, Shi y Lin, 2012; Zhao, Chen, Yang, Yuan, Charlton y Sun, 2017; Chen, Zhao, Li y Sun, 2017). Las subestructuras principales se representan en la Figura 13.

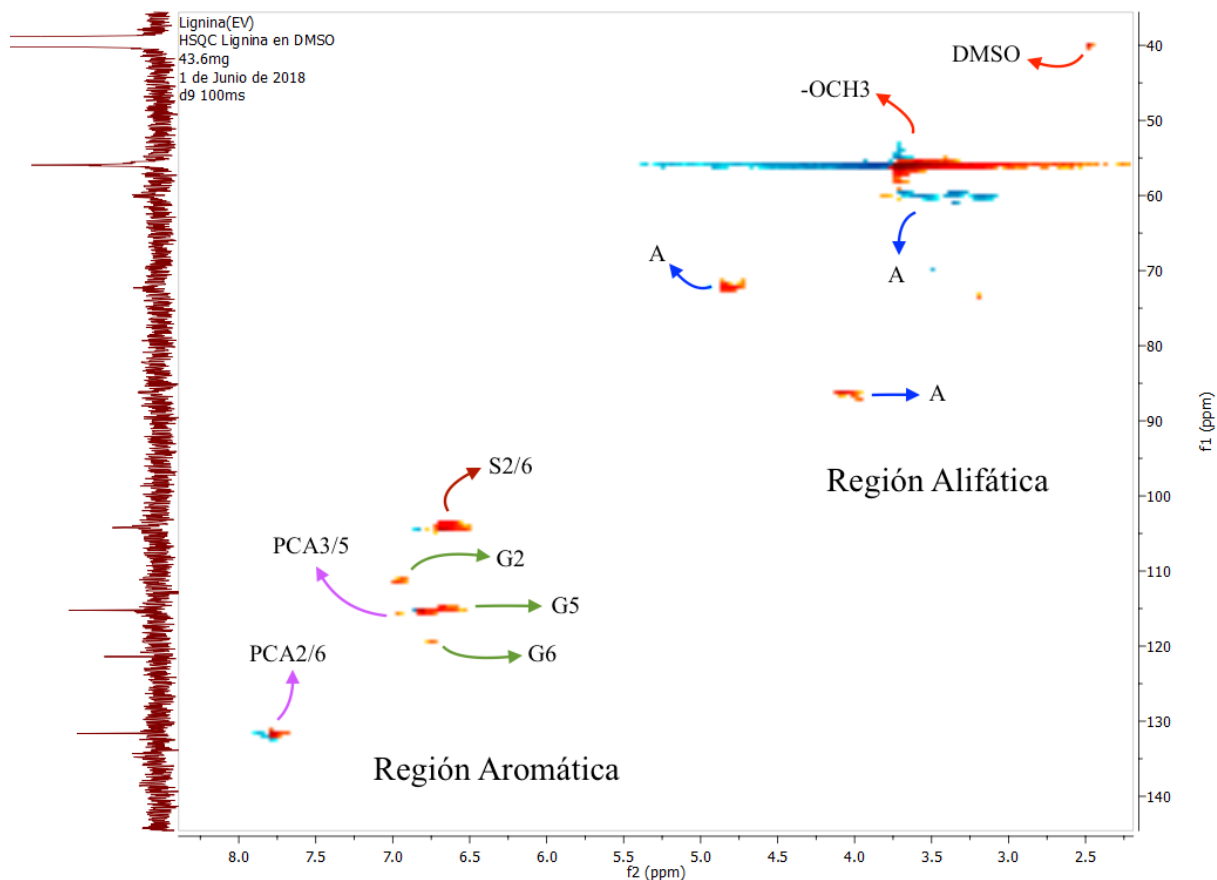


Figura 17. Espectro HSQC obtenido de la muestra de lignina: (a). Región alifática, (b). Región aromática.

En la región aromática, los resultados mostraron unidades estructurales básicas de lignina típicas para una muestra de madera dura, las cuales contienen estructuras Siringil y Guayacil (Figura 4). También se observan señales características del ácido *p*-cumárico esterificado. La literatura reporta que la pared celular contiene una pequeña cantidad de derivados de ácido hidroxicinámico unidos a éster, tales como los constituyentes fenólicos *p*-CA (ácido *p*-cumárico) y FA (ácido ferúlico) actuando como puente entre la lignina y los polisacáridos en la planta (Hartley y Ford, 1989). Una cantidad considerable de estos hidroxicinamatos permanecieron en fracciones de lignina extraídas con la solución 5% de NaOH debido a que el ácido *p*-cúmarico está ligado a la cadena lateral de la lignina y se considera que el *p*-hidroxibenzoato (PB) acila

exclusivamente la posición γ de las cadenas laterales de la S-lignina (Yuan *et al.*, 2011; Ralph y Lu, 1998; Morrel *et al.*, 2004).

Tabla 4.

Asignación a las señales obtenidas en el espectro 2D HSQC.

Descripción	δ_C/δ_H	Asignación
-OCH ₃	56.05/2.3-4.8	C-H en metoxilos
A $_{\gamma}$	60.0/3.1-3.7	C $_{\gamma}$ -H $_{\gamma}$ en subestructuras de β -O-4' (A).
A $_{\alpha}$	72.25/4.81	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ en subestructuras de β -O-4' (A).
A $_{\beta(S)}$	86.45/4.01	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ en subestructuras de β -O-4' (A).
S _{2,6}	104.21/6.62	C _{2,6} -H _{2,6} en unidades de Siringil eterificado (S).
G ₂	111.5/6.93	C ₂ -H ₂ en unidades de Guayacil (G).
G ₅	115.31/6.71	C ₅ -H ₅ en unidades de Guayacil (G).
ρ -CA _{3,5}	115.31/6.97	C _{3,5} -H _{3,5} en ácido <i>p</i> -cumárico esterificado. (<i>p</i> CA)
G ₆	119.31/6.74	C ₆ -H ₆ en unidades de Guayacil (G).
ρ -CA _{2,6}	131.76/7.76	C _{2,6} -H _{2,6} en ácido <i>p</i> -cumárico esterificado. (<i>p</i> CA)

6.4. Espectro 2D HMBC.

El experimento HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) proporciona correlaciones entre carbonos y protones que están separados por dos, tres y, a veces en sistemas conjugados, cuatro o más enlaces. Se suprimen las correlaciones directas de un enlace. Esto proporciona información de conectividad muy parecida a un COSY de proton-proton. La intensidad de los picos cruzados depende de la constante de acoplamiento, que para los acoplamientos de tres enlaces sigue la relación de Karplus. Para ángulos diedros cerca de 90 grados, el acoplamiento es casi cero. Por lo tanto, la ausencia de un pico cruzado no confirma que los pares carbono-protón estén separados por muchos enlaces.

El espectro HMBC obtenido de la muestra de lignina (Figura 18), nos revela diferentes correlaciones entre carbonos que se encuentran a cuatro o más enlaces de distancia presentes en la subestructura A (Figura 19) correspondientes a una unión de tipo β -O-4'. Las señales obtenidas en

este análisis se listan en la Tabla 5 y se definieron de acuerdo con los resultados obtenidos previamente en los experimentos RMN ^{13}C y HSQC.

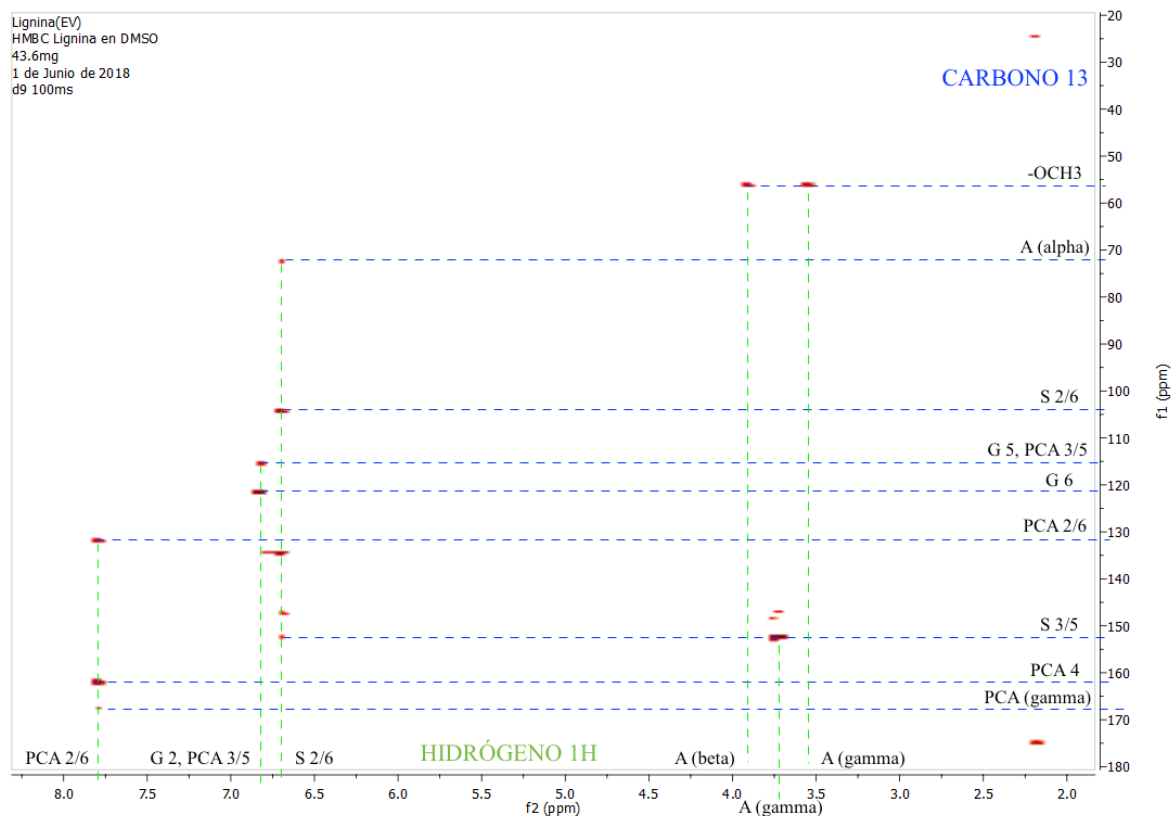


Figura 18. Espectro HMBC de la muestra de lignina.

Tabla 5.

Asignación a las señales obtenidas en el espectro 2D HMBC.

Carbono/Protón	$\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$	Asignación
-OCH ₃ / A _{γ}	56.05/3.52	C en metoxilos / H _{γ} en subestructuras de β -O-4' (A).
-OCH ₃ / A _{β}	56.05/3.91	C en metoxilos / H _{β} en subestructuras de β -O-4' (A).
A _{α} / S _{2,6}	72.25/6.72	C _{α} en subestructuras de β -O-4' (A) / H _{2,6} en Siringil (S).
S _{2,6} / S _{2,6}	104.21/6.72	C _{2,6} en Siringil (S) / H _{2,6} en Siringil (S).
G ₅ / G ₂	115.31/6.80	C ₅ en Guayacil (G) / H ₂ en Guayacil (G).
ρ -CA _{3,5} / ρ -CA _{3,5}	115.31/6.80	C _{3,5} en ácido <i>p</i> -cumárico / H _{3,5} en ácido <i>p</i> -cumárico (<i>p</i> CA).
G ₆ / G ₂	121.40/6.80	C ₆ en Guayacil (G) / H ₂ en Guayacil (G).
ρ -CA _{2,6} / ρ -CA _{2,6}	131.76/7.76	C _{2,6} en ácido <i>p</i> -cumárico / H _{2,6} en ácido <i>p</i> -cumárico (<i>p</i> CA).
S _{3,5} / A _{γ}	152.20/3.72	C _{3,5} en Siringil (S) / H _{γ} en subestructuras de β -O-4' (A).
S _{3,5} / S _{2,6}	152.20/6.72	C _{3,5} en Siringil (S) / H _{2,6} en Siringil (S).
ρ -CA ₄ / ρ -CA _{2,6}	161.71/7.76	C ₄ en ácido <i>p</i> -cumárico / H _{2,6} en ácido <i>p</i> -cumárico (<i>p</i> CA).
ρ -CA _{γ} / ρ -CA _{2,6}	167.29/7.76	C _{γ} en ácido <i>p</i> -cumárico / H _{2,6} en ácido <i>p</i> -cumárico (<i>p</i> CA).

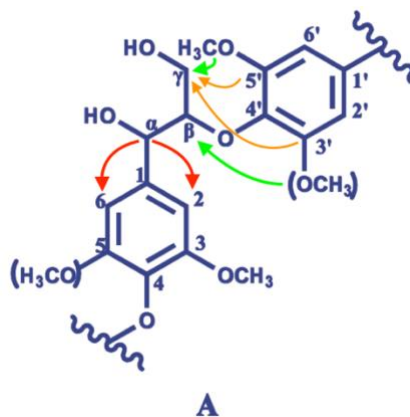


Figura 19. Interacciones entre núcleos Carbono-Hidrógeno presentes en la estructura tipo β -O-4'.

Gracias al espectro HMBC podemos observar las interacciones que existen entre los carbonos del sustituyente metoxilo (-OCH₃) con protones ubicados en las posiciones H_β y H_γ, también se registran señales correspondientes a correlaciones entre el carbono de la posición C_α con los protones ubicados en la posición H_{2/6} del anillo aromático de la estructura Siringil, además, se presentan interacciones entre los núcleos de carbono en posición C_{3/5} de la estructura Siringil y los protones ubicados en la posición H_γ (Figura 19). Estos resultados certifican que la lignina estudiada solo se encuentra en estructuras con enlaces tipo β -O-4'. Las señales restantes representan interacciones entre carbonos y protones en los anillos aromáticos correspondientes a cada una de las moléculas Guayacil, Siringil y el ácido *p*-Cumárico (Figura 20).

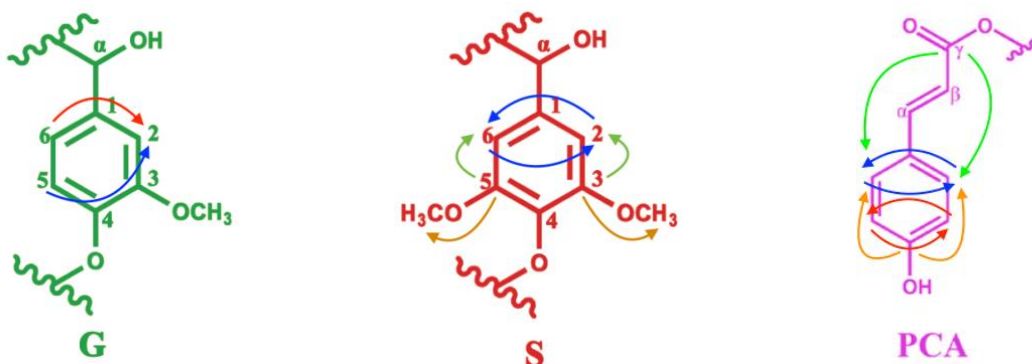


Figura 20. Interacciones entre nucleos de Carbono-Protón en las estructuras Guayacil, Siringil y ácido *p*-cumárico.

6.5. Espectro 1D ^{13}C HPDEC.

La técnica HPDEC (Figura 21) se utiliza principalmente para eliminar interacciones dipolares entre núcleos de carbonos y protones. En el espectro obtenido de la muestra analizada, las señales que se encuentran aproximadamente en δ_c 153.34, 134.61 y 55.81 ppm nos confirman nuevamente la presencia de las estructuras siringil, guayacil y el sustituyente metoxilo característicos de la lignina. Como estas señales no están claramente resueltas, no se pueden asignar a algún núcleo de carbono en específico. Las señales correspondientes a las estructuras alifáticas son las que mejor se resuelven y pueden definirse fácilmente. La señal en δ_c 14.51 ppm se atribuye principalmente a la presencia de un carbono, $\text{CH}_3\text{-R}$. Las señales próximas en el espectro corresponden a los núcleos de carbono $^*\text{CH}_2$ de diferente naturaleza y se listan en la Tabla 6 (Mao, Cao, Olk, Chu y Schmidt, 2017).

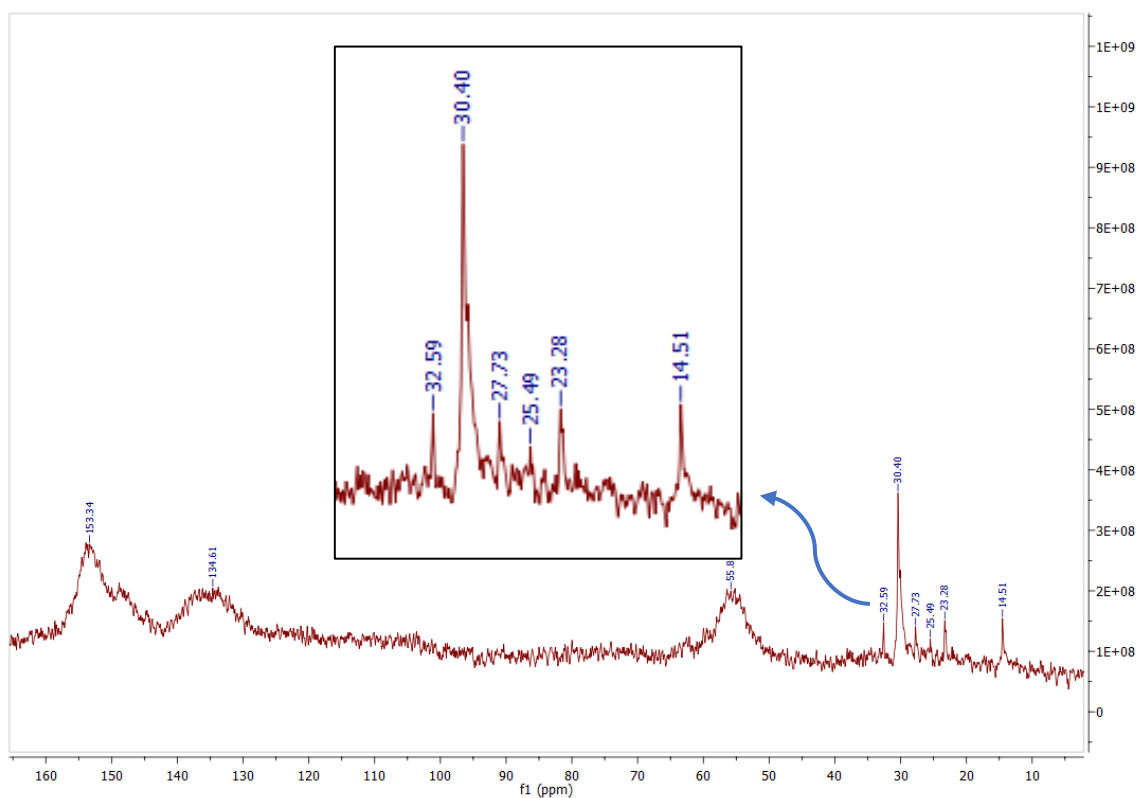


Figura 21. Espectro ^{13}C HPDEC obtenido de la muestra de lignina.

Tabla 6.
Asignación a las señales del residuo alifático del espectro ^{13}C HPDEC.

Descripción	δ_{C}
CH_3	14.51
$\text{CH}_3^*\text{CH}_2\text{-R}$	23.28
$\text{R-}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$	25.49
$\text{R-}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHR}_2$	27.73
$(\text{CH}_2)_{\text{n}>4}$	30.40
$\text{R-}^*\text{CH}_2\text{COO}$	32.59

Con estos datos obtenidos del experimento HPDEC, se definió una estructura aproximada al residuo alifático encontrado en la muestra: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$.

6.6. Espectro 1D ^{13}C CP/TOSS.

El espectro de resonancia CP/TOSS (Figura 22) nos proporciona información cualitativa de carbonos presentes en la estructura de lignina de la muestra analizada. Se observan señales características de la estructura del ácido *p*-cumárico de los carbonos C_γ , C_4 y $\text{C}_{3/5}$ definidas en δ_{C} 172.96, 162.37 y 115.09 ppm, respectivamente. También se encuentran señales correspondientes a las estructuras guayacil y siringil cuantificadas anteriormente. Para la estructura siringil se localizan señales en δ_{C} 152.87, 147.85, 133.08 y 103.43 ppm correspondientes a sus carbonos $\text{C}_{3/5}$ (eterificado), $\text{C}_{3/5}$, $\text{C}_{1/4}$ y $\text{C}_{2/6}$, respectivamente. En la estructura guayacil podemos encontrar señales equivalentes a los carbonos $\text{C}_{1/4}$, C_1 (eterificado), C_6 y C_5 en los desplazamientos δ_{C} 147.85, 133.08, 121.51 y 115.09 ppm, respectivamente. Además, se localizan señales de los carbonos C_β y C_α de la estructura de lignina de tipo $\beta\text{-O-4}'$ en δ_{C} 84.18 y 73.66 ppm, respectivamente. La señal en δ_{C} 55.85 ppm representa al carbono del grupo metoxilo.

Adicional a estas señales que reflejan las estructuras principales que conforman la lignina, aparecen señales débiles en δ_C 33.18, 30.38 y 25.17 ppm que pueden corresponder a estructuras alifáticas R_4C , R_3CH y R_2CH_2 , que en experimentos anteriores no se habían detectado. Estas señales se listan en la Tabla 7 y se definieron con la ayuda de publicaciones anteriores (Mao *et al.*, 2006; Bardet *et al.*, 2009; Habets, Wild, Huijgen y Eck, 2013).

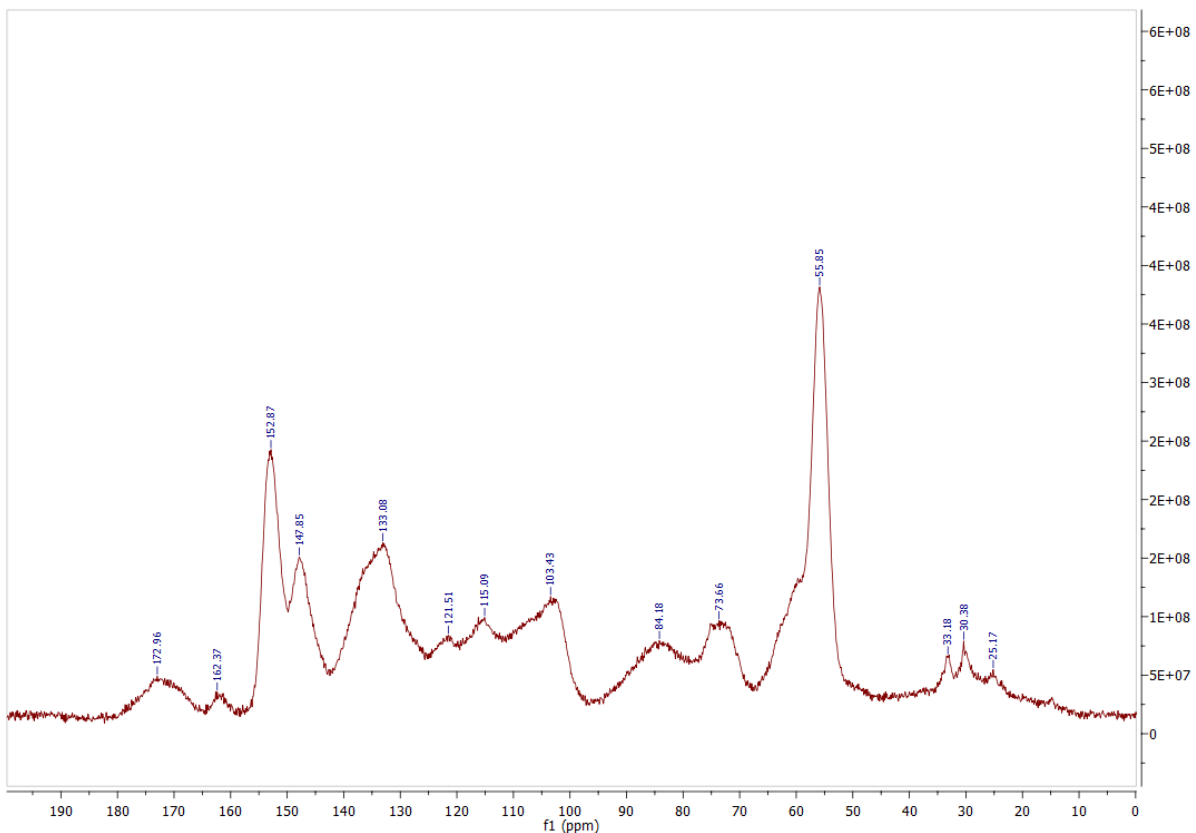


Figura 22. Espectro ^{13}C CP/TOSS de la muestra de lignina.

Tabla 7.

Asignación a las señales obtenidas en el espectro ^{13}C CP/TOSS.

Descripción	δ_C	Asignación
R_2CH_2	25.17	C en estructuras alifáticas.
R_3CH	30.38	C en estructuras alifáticas.
R_4C	33.18	C en estructuras alifáticas.
$-OCH_3$	55.85	C en metoxilos.
C_α	73.66	C_α en subestructuras β -O-4' (A).
C_β	84.18	C_β en subestructuras β -O-4' (A).
$S_{2,6}$	103.43	$C_{2,6}$ en unidades Siringil (S).

G ₅	115.09	C ₅ en unidades Guayacil (G).
ρ -CA _{3,5}	115.09	C _{3,5} en unidades ácido <i>p</i> -cumárico (<i>p</i> CA).
G ₆	121.51	C ₆ en unidades Guayacil (G).
G ₁ , S _{1/4}	133.08	C ₁ en Guayacil eterificado (G), C _{1,4} en Siringil (S).
G _{1/4} , S _{3/5}	147.85	C _{1,4} en Guayacil (G), C _{3,5} en Siringil (S).
S _{3,5}	152.87	C _{3,5} en unidades Siringil eterificado (S).
ρ -CA ₄	162.37	C ₄ en unidades ácido <i>p</i> -cúmarico. (<i>p</i> CA)
ρ -CA _{γ}	172.96	C _{γ} en unidades ácido <i>p</i> -cumárico. (<i>p</i> CA)

6.7. Espectro 2D ¹³C-¹H HETCOR.

Este experimento bidimensional provee resolución de señales correspondientes a las interacciones que existe entre carbonos y protones a un enlace de distancia. Como se puede observar en el espectro HETCOR obtenido de la muestra (Figura 23), las señales que se encuentran en los desplazamientos δ_C/δ_H 50-110/3-11 ppm equivalen a la estructura de lignina.

Tabla 8.

Asignación a las señales de lignina obtenidas en el espectro 2D HETCOR.

Descripción	δ_C/δ_H	Asignación
R ₂ CH ₂	30.00/2.23	C-H ₂ en estructuras alifáticas.
R ₃ CH	33.10/2.23	C-H en estructuras alifáticas.
-OCH ₃	55.10/4.39	C-H ₃ en metoxilos
A _{γ}	60.0/4.10	C _{γ} -H _{γ} en subestructuras de β -O-4' (A).
A _{α}	72.25/5.02	C _{α} -H _{α} en subestructuras de β -O-4' (A).
S _{2,6}	102.50/7.03	C _{2,6} -H _{2,6} en unidades de Siringil eterificado (S).

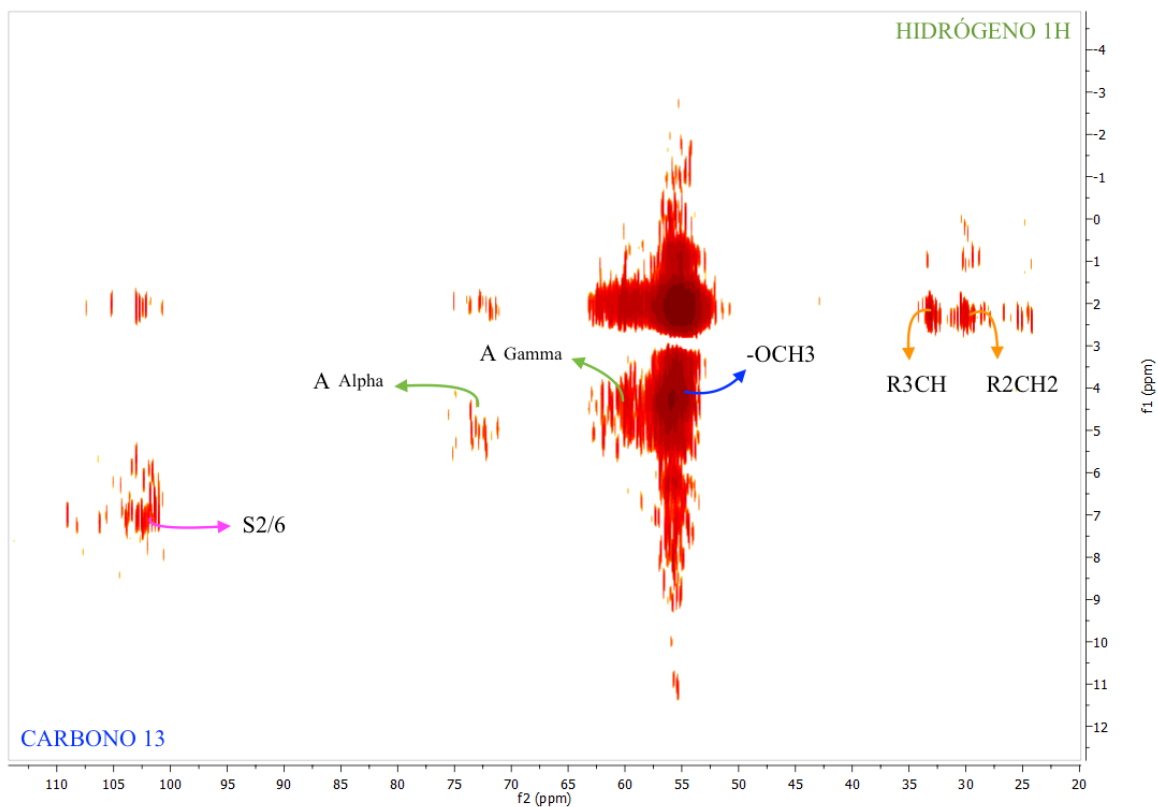


Figura 23. Espectro 2D HETCOR de la muestra de lignina.

La señal con mayor intensidad en δ_C/δ_H 55.10/4.39 ppm, pertenece al grupo metoxilo (-OCH₃), que se encuentra enlazado a los anillos aromáticos de la estructura guayacil y siringil. También se identifican señales características de una estructura de lignina β -O-4', correspondiente a los enlaces C $_{\gamma}$ -H $_{\gamma}$ y C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ con desplazamientos en δ_C/δ_H 60.00/4.10 y 72.25/5.02 ppm, respectivamente. Además, se identifica una señal equivalente a los enlaces entre carbonos y protones C_{2,6}-H_{2,6} de la estructura siringil en posición δ_C/δ_H 102.50/7.03 ppm. De igual forma, se registran señales del residuo alifático presente en la muestra. Estas señales se listan en la tabla 8.

De acuerdo con el desplazamiento químico en carbono de δ_C 55.10, 60.0, 72.25 y 102.50 ppm con la correlación de protones en δ_H 2-2.5 ppm, podría deberse a la interacción entre los carbonos de la estructura de lignina y protones de la estructura alifática. De hecho, la medición de HETCOR

en estado sólido permite correlaciones entre el carbono y el protón a través del espacio (Brech *et al.*, 2014). Estas correlaciones indican que los carbonos de la lignina están estrechamente asociados con los protones del residuo alifático presente en la biomasa.

7. Conclusiones

Se considera que la metodología utilizada para la extracción y purificación de lignina de la muestra de biomasa fue óptima, ya que únicamente en los experimentos de resonancia en estado sólido se presentan señales débiles correspondientes a residuos alifáticos. Esto permitió que las correlaciones en cada uno de los espectros no se vieran interferidas por señales de carbohidratos o residuos de celulosa y hemicelulosa.

El peso total de la muestra de lignina extraída y purificada fue de 0,412g, representando el 1,37% de 30g de muestra inicial. Estos gramos de lignina extraída fueron suficientes para realizar los experimentos RMN ya que esta es una técnica no destructiva y necesita de muy poca cantidad de muestra para operar. A pesar de que este porcentaje de extracción es bajo, es necesario aclarar que la muestra proviene de biomasa residual que actualmente produce 1.660.000 Toneladas por año. Por lo tanto, con solo extraer 1,37% de lignina, podemos verificar que este tipo de biomasa posee un potencial energético no aprovechado. Además, en próximos estudios se pueden plantear modificaciones a la metodología de extracción para mejorar su rendimiento.

La cuantificación de las estructuras que conforman la lignina se realizó principalmente con los experimentos de resonancia magnética nuclear en estado líquido, ya que estos arrojaron datos más significativos. En el espectro HSQC, principalmente se obtienen correlaciones que reflejan una

estructura de lignina conformada por dos monolignoles precursores de la lignina nativa: guayacil y siringil, con presencia del ácido *p*-cumárico. Además, muestra indicios de que estas moléculas conforman una cadena de lignina de tipo β -O-4'.

Con la ayuda del espectro carbono 13 se cuantificó las unidades por anillo aromático de guayacil y siringil característico de una lignina proveniente de madera dura. Como resultado, se encuentra que la subestructura siringil esta en mayor proporción con relación Siringil/Guayacil de 2.92. Se afirma que la lignina extraída de la muestra de biomasa tiene una estructura de tipo β -O-4', ya que una relación alta S/G promueve este tipo de enlace. Como el experimento DEPT 135° tiende a ser mas sensible que el carbono convencional, se observan señales correspondientes a los carbonos C_{α} , C_{β} y C_{γ} , que el espectro de carbono 13 convencional no registra. Estas señales además de confirmarnos la estructura del enlace de unión de la lignina, nos demuestra que puede presentarse en dos diastereoisómeros: erythro y threo. Estas señales no fueron posibles cuantificarse, ya que no hubo un sistema de referencia en el espectro para realizar las debidas integraciones.

El espectro bidimensional HMBC permite observar interacciones entre carbonos y protones a mas de 1 enlace de distancia, resaltando que la estructura de lignina se presenta únicamente en enlace tipo β -O-4', ya que se registran interacciones entre los núcleos de carbono y protón ubicados en la posición alpha, beta y gamma con los núcleos de carbono y protón de la estructura siringil y el sustituyente metoxilo. Estas mismas interacciones no ocurren en la estructura guayacil debido a que se encuentra en menor proporción, por consiguiente, las interacciones entre los núcleos de carbono y protón en estas ubicaciones no alcanzan a ser percibidas o no ocurren.

En el espectro CP/TOSS se observan señales que no se encuentran bien resueltas y representan a carbonos ya cuantificados en los espectros RMN en estado líquido. Lo más importante de este experimento se debe al registro de señales débiles correspondientes a carbonos de residuos de estructuras alifáticas que previamente no se habían encontrado. Con la ayuda de la secuencia de pulso HPDEC para desacoplar la interacción entre carbonos y protones estas señales se resuelven mucho mejor asignando una estructura aproximada para este residuo alifático. Esta estructura puede variar en tamaño, ya que la señal dispuesta en δ 30.40 ppm indica la presencia de carbonos $(CH_2)_{n>4}$ en mayor cantidad respecto a las otras señales. El espectro HETCOR registra interacciones a un enlace de distancia entre carbonos y protones en la estructura de lignina, pero principalmente nos demuestra que los carbonos de la lignina están estrechamente asociados a los protones del residuo alifático. Estas señales aparecen debido a que este experimento en sólidos en algunas ocasiones permite correlaciones entre carbonos y protones a través del espacio.

Finalmente se puede concluir que la lignina extraída de la biomasa residual de palma es característica de una lignina proveniente de madera dura, con relación Siringil/Guayacil de 2,92 y polimerizada en enlaces de tipo β -O-4'. Con la ayuda de la caracterización de lignina presentada en este estudio, podría plantearse próximamente una metodología para la modificación química de esta molécula y así aprovechar el gran potencial energético que poseen estos subproductos industriales.

Referencia bibliográfica

- Acosta, J., Torres, P., Olmedo, J., Vega, A., Flores, S. y Zaragoza, E. (2018). Lignin in storage and renewable energy applications: A review. *Journal of energy chemistry*, 0, 1-17.
- Akiyama, T., Sugimoto, T., Matsumoto, Y. y Meshitsuka, G. (2002). Erythro/threo ratio of β -0-4 structures as an important structural characteristic of lignin. I: Improvement of ozonation method for the quantitative analysis of lignin side-chain structure. *The Japan wood research society*, 48, 210-215.
- Apperley, D., Harris, R. y Hodgkinson, P. (2012). *Solid-state NMR: Basic principles & practice*. New York, USA: Momentum press.
- Argyropoulos, D. y Menachem, S. (1997). Lignin. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 57, 128-151.
- Balakshin, M., Capanema, E., Gracz, H., Chang, H. y Jameel, H. (2011). Quantification of lignin-carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy. *Planta*, 233, 1097-1110.
- Balci, M. (2005). *Basic 1H - and ^{13}C -NMR Spectroscopy*. Ankara, Turquía: Elsevier.
- Bardet, M., Gerbaud, G., Giffard, M., Doan, C., Hediger, S. y Pape, L. (2009). ^{13}C high-resolution solid-state NMR for structural elucidation of archaeological woods. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, 55, 199-214.
- Belton, P. y Tanner, S. (1989). High-resolution solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy of Tunicin, an animal cellulose. *Macromolecules*, 22, 1615-1617.
- Bolaños, J., Felizón, B., Heredia, A. y Jiménez, R. (1999). Characterization of the lignin obtained by alkaline delignification and of the cellulose residue from steam-exploded olive stones. *Bioresource technology*, 68, 121-132.
- Brech, Y., Delmotte, L., Raya, J., Brosse, N., Gadiou, R. y Dufour, A. (2014). High resolution solid state 2D NMR analysis of biomass and biochar. *Analytical chemistry*, 87, 843-847.
- Brech, Y., Raya, J., Delmotte, L., Brosse, N., Gadiou, R. y Dufour, A. (2016). Characterization of biomass char formation investigated by advanced solid state NMR. *Carbon*, 108, 165-177.

- Capanema, E., Balakshin, M. y Kadla J. (2004). A comprehensive approach of quantitative lignin characterization by NMR spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 1850-1860.
- Chávez-Sifontes, M. y Domine, M. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en ciencias e ingeniería*, 4(4), 15-46.
- Chen, B., Zhao, B., Li, M. y Sun, R. (2017). Characterization of lignins isolated with alkali from the hydrothermal or dilute-acid pretreated rapessed straw during bioethanol production. *International journal of biological macromolecules*, 106, 885-892.
- De Chirico, A., Armanini, M., Chini, P., Cioccolo, G., Provasoli, F. y Audisio, G. (2003). Flame retardants for polupropylene based on lignin. *Polymer degradation and stability*, 79, 139-145.
- Duer, M. (Ed.). (2002). *Solid State NMR Spectroscopy, Principles and Applications*. Cambridge, Reino Unido: Editorial Blackwell Science.
- Field, L., Li, H. y Magill, A. (2015). *Organic structures from 2D NMR spectra*. Sydney, Australia: John Wiley & Sons Ltd.
- Furrer, J. (2012). A comprehensive discussion of HMBC pulse sequences. 2. Some useful variants. *Concepts in magnetic resonance*, 40, 146-169.
- González, F., Almendros, G., Rio, J., Martín, F., Gutiérrez, A. y Romero, J. (1999). Ease of delignification assessment of wood from different Eucalyptus species by pyrolysis (TMAH)-GC/MS and CP/MAS ¹³C-NMR spectrometry. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 49, 295-305.
- Guerra, A., Filpponen, I., Lucia, L. y Argyropoulos, D. (2006). Comparative evaluation of three lignin isolation protocols for various wood species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 9696-9705.
- Habets, S., Wild, P., Huijgen, W. y Eck, E. (2013). The influence of thermochemical treatments on the lignocellulosic structure of wheat straw as studied by natural abundance ¹³C NMR. *Bioresource Technology*, 146, 585-590.
- Hage, R., Brosse, N., Chrusciel, L., Sanches, C., Sannigrahi, P. y Ragauskas, A. (2009). Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from miscanthus. *Polymer degradation and stability*, 94, 1632-1638.

- Hartley, R. y Ford, C. (1989). Phenolic constituents of plant cell walls and wall biodegradability. *Plant cell wall polymers*, 399(9), 137-145.
- Heikkinen, S., Toikka, M., Karhunen, T. y Kilpelainen, I. (2003). Quantitative 2D HSQC (Q-HSQC) via suppression of J-dependence of polarization transfer in NMR spectroscopy: application to wood lignin. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 4362-4367.
- Holtman, K., Chang H. y Jameel H. (2006). Quantitative ^{13}C NMR characterization of milled wood lignins isolated by different milling techniques. *Journal of wood chemistry and technology*, 26, 21-34.
- Isikgor, F. y Becer C. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer chemistry*, 6, 4497-4559.
- Lamber, J. y Mazzola, E. (2004). *Nuclear magnetic resonance spectroscopy an introduction to principles, applications, and experimental methods*. Saddle River, New Jersey: Pearson Education
- Landucci, L. (1985). Quantitative ^{13}C characterization of lignin. *Holzforschung*, 39, 355-359.
- Laurichesse, S. y Aérous L. (2014). Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. *Progress in polymer science*, 39, 1266-1290.
- Lora, J. y Glasser, W. (2002). Recent industrial applications of lignin: a sustainable alternative to nonrenewable materials. *Journal of polymers and the environmental*, 10(1/2), 39-48.
- Mann, D., Labbé, N., Skyes, R., Gracom, K., Kline, L., Swamidoss, I., Burris, Jason., Davis, M. y Stewart, C. (2009). Rapid assessment of lignin content and structure in Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) grown under different environmental conditions. *Bioenergy research*, 2, 246-256.
- Mao, J., Cao, X., Olk, D., Chu, W. y Schmidt, K. (2017). Advanced solid-state NMR spectroscopy of natural organic matter. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, 100, 17-51.
- Mao, J., Holtman, K., Scott, J., Kadla, J. y Schmidt, K. (2006). Differences between lignin in unprocessed wood, milled wood, mutant wood, and extracted lignin detected by ^{13}C solid-state NMR. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 9677-9686.
- Meng, L., Kang, S., Zhang, X., Wu, Y. y Sun, R. (2012). Isolation and physico-chemical characterization of lignin from hybrid poplar in DMSO/LiCl system induced by microwave-assited irradiation. *Cellulose chemistry and technology*, 46(5-6), 409-418.

- Morreel, K., Ralph, J., Kim, H., Lu, F., Goeminne, G., Ralph, S., Messens, E. y Boerjan, W. (2004). Profiling of oligolignols reveals monolignol coupling conditions in lignifying poplar xylem. *Plant physiol*, 136, 3537-3549.
- Myrvold, B. (2008). A new model for the structure of lignosulphonates part 1. Behaviour in dilute solutions. *Industrial crops and products*, 27, 214-219.
- Norgren, M. y Edlund, H. (2014). Lignin: Recent advances and emerging applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19, 409-416.
- Patiño, P. (2014). Biomasa residual vegetal: tecnologías de transformación y estado actual. *Innovaciencia*, 2(1), 45-52.
- Pouteau, C., Baumberger, S., Cathala, B. y Dole, P. (2004). Lignin-polymer blends: evaluation of compatibility by image analysis. *Comptes rendus biologies*, 327, 935-943.
- Pouteau, C., Dole, P., Cathala, B., Averous, L. y Boquillon, N. (2003). Antioxidant properties of lignin in polypropylene. *Polymer degradation and stability*, 81, 9-18.
- Ralph, J. y Lu, F. (1998). The DFRC method for lignin analysis. Part 6. A modified method to determine acetate regiochemistry on native and isolated lignins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46, 4616-4619.
- Ralph, J., Akiyama, T., Kim, H., Lu, F., Schatz, P., Marita, J., Ralph, S., Reddy, M., Chen, F. y Dixon, R. (2006). Effects of coumarate 3-hydroxylase down-regulation on lignin structure. *J. Biol. Chem*, 281, 8843-8853.
- Shi, Z., Xiao, L., Deng, J. y Sun, R. (2013). Isolation and structural characterization of lignin polymer from *Dendrocalamus sinicus*. *Bioenerg. Res.*, 6, 1212-1222.
- Sun, R., Tomkinson, J., Sun, X. y Wang, N. (2000). Fractional isolation and physico-chemical characterization of alkali-soluble lignins from fast-growing poplar wood. *Polymer*, 41, 8409-8417.
- Sun, Y., Wen, J., Xu, F. y Sun, R. (2010). Fractional and structural characterization of organosolv and alkaline lignins from *Tamarix austromogoliac*. *Scientific research and essays*, 5(24), 3850-3864.
- Tang, H. y Wang, Y. (2008). High-resolution solid-state NMR spectroscopy of starch polysaccharides. *Modern magnetic resonance*, 1783-1791.

- Terashima, N., Atalla, R. y Vanderhart, D. (1997). Solid state NMR spectroscopy of specifically ^{13}C -enriched lignin in wheat straw from coniferin. *Phytochemistry*, 46, 863-870.
- Van de Pas, D., Hickson, A., Donaldson, L., Jones, G., Tamminen, T., Fernyhouh, A. y Mattinen, M-L. (2011). Characterization of fractionated lignins polymerized by fungal laccases. *BioResources*, 6(2), 1105-1121.
- Watkins, D., Nuruddin, M., Hosur, M., Tcherbi-Narteh, A y Jeelani, S. (2015). Extraction and characterization of lignin from different biomass resources. *Journal of materials research and technology*, 4(1), 26-32.
- Wikberg, H. y Maunu, S. (2004). Characterization of thermally modified hard- and softwoods by ^{13}C CPMAS NMR. *Carbohydrate polymers*, 58, 461-466.
- Wu, S. y Argyropoulos, S. (2003). An improved method for isolating lignin in high yield and purity. *J. Pulp Paper Sci*, 29, 235-240.
- Yang, Q., Shi, J. y Lin, L. (2012) Characterization of structural changes of lignin in the process of cooking of bagasse with solid alkali and active oxygen as a pretreatment for lignin conversion. *Energy and fuels*, 26, 6999-7004.
- You, T., Zhang, L., Zhou, S. y Xu, F. (2015). Structural elucidation of lignin-carbohydrate complex (LCC) preparations and lignin from *Arundo donax* lignin. *Industrial crops and products*, 71, 65-74.
- Yuan, T., Sun, S., Xu, F. y Sun, R. (2011). Characterization of lignin structures and lignin-carbohydrate complex (LCC) linkages by quantitative ^{13}C and 2D HSQC NMR spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*. 59, 10604-10614.
- Yuan, T., Sun, S., Xu, F. y Sun, R. (2011). Structural characterization of lignin from Triploid of *populus tomentosa* carr. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 6605-6615.
- Zakzeski J., Bruijninx, P., Jongerius, A. y Weckhuysen, B. (2010). The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *American chemical society*, 110, 3552-3599.
- Zhang, A., Liu, C., Sun, R. y Xie, J. (2013). Extraction, purification, and characterization of lignin fractions from Sugarcane Bagasse. *BioResources*, 8, 1604-1614.

Zhao, B., Chen, B., Yang, S., Yuan, T., Charlton, A. y Sun, R. (2017). Structural variation of lignin and lignin-carbohydrate complex in *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* during its growth process. *ACS sustainable chemistry and engineering*, 5, 1113-1122.

Zhao, J., Xiuwen, W., Hu, J., Liu, Q., Shen, D. y Xiao R. (2014). Thermal degradation of softwood lignin and hardwood lignin by TG-FTIR and Py-GC/MS. *Polymer degradation and stability*, 108, 133-138.

Zhao, Q. y Dixon, A. (2011). Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought?. *Trends in plant science*, 16(4), 227-233.